

## Návod pro použití

# AD Ab ELISA

**REF** AD0480



Souprava pro profesionální použití

## GMP



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. &  
Křížkova 68, 612 00 Brno, Czech Republic  
Tel.: +420 541 248 311  
FAX: +420 541 243 390  
E-mail: [info@testlinecd.com](mailto:info@testlinecd.com)  
[www.testlinecd.cz](http://www.testlinecd.cz)  
[www.testlinecd.com](http://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](mailto:podatelna@vri.cz)  
[www.vri.cz](http://www.vri.cz)

**OBSAH**

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Úvod .....</b>                                      | <b>3</b>  |
| <b>2</b>  | <b>Princip testu.....</b>                              | <b>3</b>  |
| <b>3</b>  | <b>Složení soupravy .....</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>4</b>  | <b>Další potřebné vybavení k provedení testu .....</b> | <b>5</b>  |
| <b>5</b>  | <b>Skladování a expirace soupravy .....</b>            | <b>5</b>  |
| <b>6</b>  | <b>Příprava pracovních roztoků.....</b>                | <b>5</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Ředění a příprava vzorků a kontrolních sér.....</b> | <b>6</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Pracovní postup .....</b>                           | <b>7</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Pracovní schéma .....</b>                           | <b>8</b>  |
| <b>10</b> | <b>Validita testu.....</b>                             | <b>9</b>  |
| <b>11</b> | <b>Hodnocení výsledků .....</b>                        | <b>9</b>  |
| <b>12</b> | <b>Bezpečnost práce .....</b>                          | <b>10</b> |
| <b>13</b> | <b>Technické připomínky .....</b>                      | <b>10</b> |
| <b>14</b> | <b>Vysvětlení symbolů .....</b>                        | <b>12</b> |

## Imunoenzymatická souprava ke stanovení protilátek proti viru Aujeszkyho choroby prasat v krevním séru nebo mase

---

### 1 Úvod

Aujeszkyho onemocnění (Aujeszky's disease-AD) je infekční onemocnění prasat. Původcem je prasečí herpesvirus typu 1 (SHV-1) z čeledi *Herpesviridae*. Onemocnění se vyznačuje dvoufázovým průběhem, na akutní stádium infekce navazuje fáze latentní. U postižených prasat dochází v akutním stadiu k poruchám nervového systému a dýchacího ústrojí. U selat má onemocnění zpravidla fatální průběh. Prase, jako přirozený hostitel a rezervoár viru, je v době latentního stadia infekce šířitelem viru pro ostatní vnímavá zvířata, u nichž je onemocnění obvykle letální.

Diagnostika onemocnění je založena na detekci protilátek proti viru Aujeszkyho choroby (AD) v krevním séru a svalové tekutině prasat. Souprava je vhodná k průkazu infekce v chovech, ke kontrole účinnosti ochranné vakcinace i při certifikaci infekce prostých stád.

Souprava AD Ab ELISA detekuje protilátky proti kompletnímu souboru virových antigenů (není vhodná pro odlišení infikovaných zvířat od zvířat vakcinovaných gE-vakcínou).

Citlivost soupravy je nastavena na Mezinárodní standardní sérum ADV-1 v ředění 1:8.

### 2 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek ve vzorku metodou EIA, typ sandwich (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku - značená protilátka). Značená protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti prasečímu imunoglobulinu konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zabarvení na žluté. Intenzita žlutého zabarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku.

#### Použitý antigen

Purifikovaný a inaktivovaný antigen (prasečí herpesvirus typ 1)

### 3 Složení soupravy

|                 |   |            |
|-----------------|---|------------|
| MICROPLATE      | <b>Potažená destička</b><br>s navázaným antigenem, 12 × 8 jamek v sáčku se sušidlem   | 5 ks       |
| NCS             | <b>Negativní kontrolní sérum</b><br>20krát koncentrované prasečí sérum neobsahující specifické protilátky                   | 1 × 0,4 ml |
| PCS-L           | <b>Pozitivní kontrolní sérum limitní</b><br>20krát koncentrované prasečí sérum obsahující specifické protilátky             | 1 × 0,4 ml |
| CONJUGATE       | <b>Konjugát</b><br>100krát koncentrované kozí nebo králičí protilátky proti prasečímu imunoglobulinu značené peroxidázou    | 1 × 0,8 ml |
| DILUENT 13      | <b>Ředicí roztok vzorků 13</b><br>Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění  | 1 × 240 ml |
| CONJ.DILUENT 11 | <b>Ředicí roztok konjugátu 11</b><br>Pufr se stabilizátory konjugátu, v pracovním ředění                                    | 1 × 70 ml  |
| SUBSTRATE 5     | <b>TMB-Complete 5</b><br>Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , v pracovním ředění | 1 × 60 ml  |
| WASH 20x        | <b>Promývací roztok</b><br>20krát koncentrovaný pufr  | 2 × 60 ml  |
| STOP            | <b>Zastavovací roztok</b><br>Roztok kyseliny, v pracovním ředění  | 1 × 60 ml  |
|                 | <b>Pracovní návod</b>   | 1 ks       |

## 4 Další potřebné vybavení k provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety

Špičky pro jednorázové použití

Promývací zařízení

Stopky

Třepačka mikrotitračních destiček (při vyšetřování menších souborů vzorků není nezbytná)

Termostat na 37 °C s vlhkou komůrkou

Fotometr pro mikrotitrační destičky

## 5 Skladování a expirace soupravy

Soupravu skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C. Při dodržení skladovacích podmínek platí expirace uvedená na obalu soupravy. Po otevření je doporučeno soupravu spotřebovat do 3 měsíců. Souprava nesmí zmrznout!

### Vzorky a jejich skladování

Jako vzorek k vyšetření může být použito sérum nebo svalová tekutina masa. Vyšetřované vzorky je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 48 hod. Při delším skladování vzorky zmrazte na -20 °C.

## 6 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok ředte 1:20. Např. 60 ml koncentrovaného Promývacího roztoku + 1140 ml destilované vody (pro 1 destičku 15 ml Promývacího roztoku + 285 ml destilované vody).

V lahvičce s Promývacím roztokem se mohou vytvořit krystaly solí. Tyto krystaly je třeba před použitím rozpustit zahřátím na vodní lázni. Roztok po naředění je stabilní jeden týden při +2 °C až +8 °C.

Ředící roztok vzorků je v pracovní koncentraci, dále neředit!

Ředící roztok konjugátu je již v pracovní koncentraci, dále neředit!

Konjugát ředte 1:100 Ředícím roztokem konjugátu. Např. 600 µl Konjugátu doplňte Ředícím roztokem konjugátu do celkového objemu 60 ml (pro jednu destičku: 120 µl do 12 ml, pro jeden strip: 10 µl do 1 ml).

Ředění provádějte nejdříve 10 minut před použitím. Dobře promíchejte.

TMB-Complete je jednosložkový chromogenní substrátový roztok v pracovním ředění, dále neředit!

### Zaměnitelnost roztoků

Ředící roztok vzorků, Ředící roztok konjugátu a TMB-Complete jsou v EIA soupravách TestLine zaměnitelné, pokud mají stejné číselné označení (např. Ředící roztok vzorků 2, Ředící roztok vzorků 3, atd.). Promývací a Zastavovací roztok je univerzální ve všech EIA soupravách TestLine.

## 7 Ředění a příprava vzorků a kontrolních sér

Ředící roztok vzorků před použitím šetrně promíchejte.

### Ředění vzorků sér a kontrolních sér

Důkladně promíchané vzorky a kontrolní séra (PKS-L a NKS) ředíte 1:20 Ředícím roztokem vzorků.

Např.: 10 µl vzorku (kontrolního séra) + 190 µl Ředícího roztoku vzorků.

Ředění provádějte v jamkách mikrotitrační destičky (viz. Pracovní postup). Dobře promíchejte.

### Příprava a ředění vzorků masa

K vyšetření vzorků masa se používá svalová tekutina připravená následujícími postupy:

- Zmrazením a rozmrazením vzorku masa. Tekutinu uvolněnou z masa po rozmrazení a kompresi použijte k testování v ředění 1:5.

Např. 40 µl tekutiny + 160 µl Ředícího roztoku vzorků.

Provádějte přímo v jamkách mikrotitrační destičky (viz. Pracovní postup). Dobře promíchejte.

- Vzorek čerstvého masa nastříhejte na drobné kousky, doplňte pufrovaným fyziologickým roztokem (1ml/1g svaloviny) a přidáním mořského písku homogenizujte v třecí misce. Homogenát přeneste do zkumavky, centrifugujte 10 min (3000 ot/min), získaný supernatant použijte k vyšetření v ředění 1:5.

Např. 40 µl supernatantu + 160 µl Ředícího roztoku vzorků.

Provádějte přímo v jamkách mikrotitrační destičky (viz. Pracovní postup). Dobře promíchejte.

Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

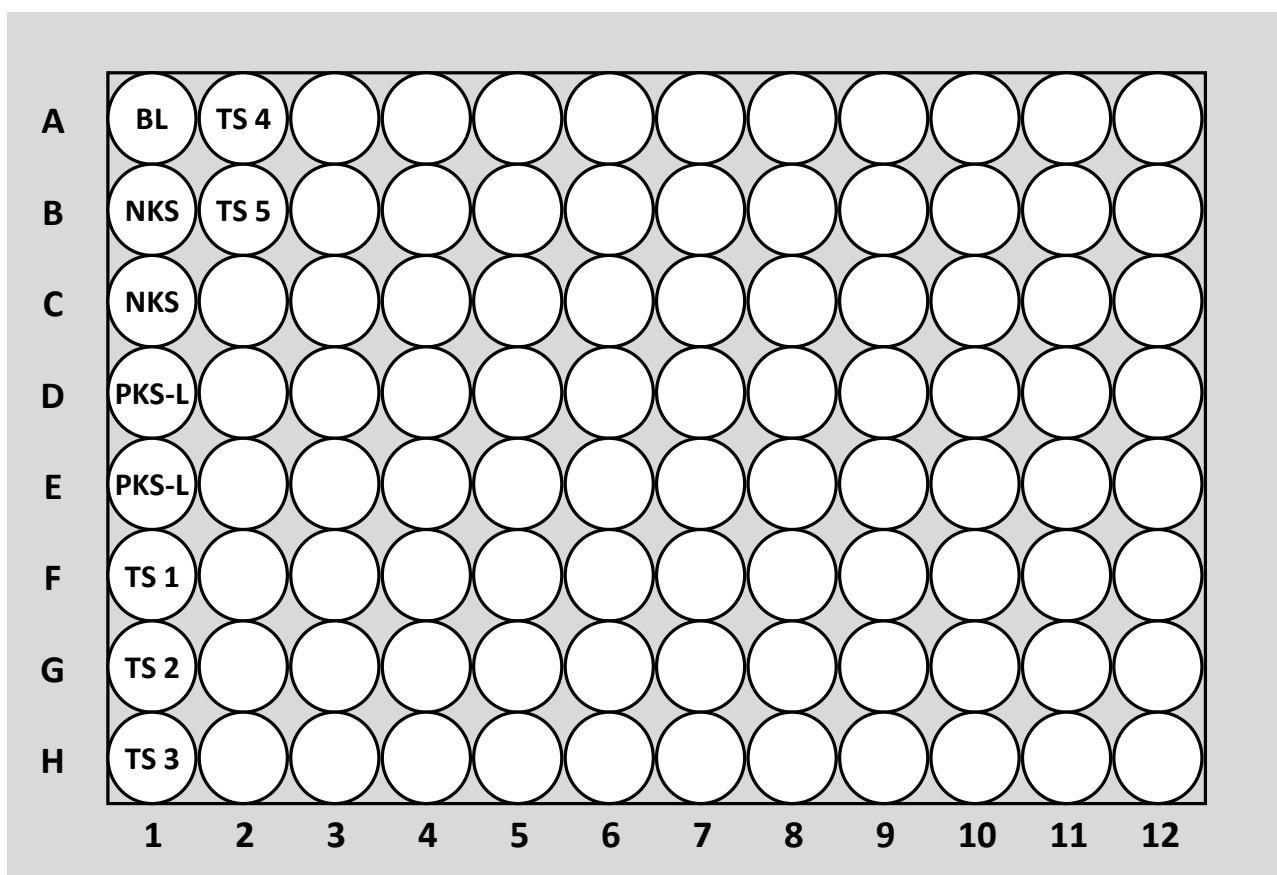
## 8 Pracovní postup

Všechny reagenty nechte vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchejte. Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

1. Dávkujte kontroly a ředěné vzorky podle pracovního schématu.
  - Pipetujte 200 µl Ředícího roztoku vzorků do jamky A1 (blank).
  - Pipetujte 190 µl Ředícího roztoku vzorků do všech zbývajících jamek.
  - Pipetujte 10 µl Negativního kontrolního séra do 2 jamek (B1, C1).
  - Pipetujte 10 µl Pozitivního kontrolního séra limitního do 2 jamek (D1, E1).
  - Pipetujte 10 µl testovaných vzorků do zbývajících jamek s Ředícím roztokem vzorků (F1 – H12).
  - Obsah jamek důkladně promíchejte (nejlépe za použití třepačky mikrotitračních destiček).
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min při 37 °C.
3. Odsajte obsah jamek a 4 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
4. Dávkujte do všech jamek 100 µl pracovního roztoku konjugátu.
5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 min při 37 °C.
6. Odsajte obsah jamek a 4 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
7. Dávkujte do všech jamek 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečištění – viz kapitola Technické připomínky.
8. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě. Sledujte pozorně vývoj modrého zbarvení, zejména v jamkách s pozitivním kontrolním sérem limitním.
9. Zastavte reakci přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
10. Změřte na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku (jamka A1), a to do 30 min po zastavení reakce.

V případě celkově slabší reakce, způsobené např. nižší laboratorní teplotou, je možné prodloužit inkubaci se substrátem až na 30 minut. Zastavte reakci v okamžiku, kdy intenzita zbarvení PKS-L odpovídá 0,500 - 2,000.

## 9 Pracovní schéma



BL 200  $\mu$ l Ředícího roztoku vzorků (Blank)

NKS 200  $\mu$ l ředěného

PKS-L 200  $\mu$ l ředěného

TS 1-x 200  $\mu$ l ředěného testovaného séra



## 10 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Absorbance blanku je menší než 0,200.

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

Absorbance Negativního kontrolního séra je menší než 1/3 násobek absorbance Pozitivního kontrolního séra limitního.

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

Absorbance Pozitivního kontrolního séra limitního je v rozmezí 0,500 až 2,000.

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

Nejsou-li tyto požadavky splněny, je výsledek testu neuspokojivý a musí být opakován.

## 11 Hodnocení výsledků

### Výpočet poměru S/P

Dělte absorbanci testovaného vzorku průměrnou absorbancí Pozitivního kontrolního séra limitního (PKS-L) naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$\text{S/P} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance PKS-L}} \times 100 [\%]$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 1).

**Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření**

| Poměr S/P [%] | Hodnocení |
|---------------|-----------|
| menší než 30  | negativní |
| 30 až 40      | hraniční  |
| větší než 40  | pozitivní |

V případě hraničního výsledku se doporučuje vyšetření opakovat z nového odběru.

## 12 Bezpečnost práce

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro.

Séra, konjugát, ředící roztok vzorků a konjugátu a veškerý materiál přicházející do styku s vyšetřovanými vzorky je nutno považovat za potenciálně infekční.

Některé reagenty obsahují toxickou složku azid sodný. Vyvarujte se kontaktu s kůží.

Zastavovací roztok obsahuje zředěný roztok kyseliny. Při práci s tímto roztokem chraňte oči a pokožku!

Je nutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce.

### První pomoc

Při zasažení očí vymývejte velkým množstvím vlažné vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Při zasažení oděvu a kůže odložte veškeré kontaminované oblečení. Pokožku omyjte velkým množstvím vody a mýdlem. Při potřísnění roztokem, který obsahuje sérum, pokožku dezinfikujte. Při náhodném požití vypláchněte ústa pitnou vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

### Likvidace zbytků po provedení testů

Veškeré pomůcky použité k provedení testu je nutné považovat vzhledem ke kontaktu s biologickým materiálem za potenciálně infekční. Proto je likvidujte společně s biologickým odpadem.

### Likvidace soupravy po expiraci

Soupravu rozeberte na jednotlivé komponenty a zlikvidujte je jako biologický materiál. Obaly a zbytky obalů likvidujte jako tříděný odpad podle místních předpisů.

## 13 Technické připomínky

Pro získání spolehlivých výsledků je nutné **přesné dodržování návodu**. Při práci používejte vždy pomůcky nejvyšší čistoty. Dávejte přednost jednorázovým pomůckám.

**Mikrotitrační destička** – před otevřením nechejte vždy sáček s mikrotitrační destičkou vytemperovat na laboratorní teplotu, aby nedošlo ke kondenzaci vodních par na povrchu destičky.

**Promývací roztok** – pro přípravu promývacího roztoku v pracovním ředění používejte vysoce kvalitní destilovanou vodu.

**Promývání** – dodržujte předepsaný počet promývacích cyklů a jamky plňte vždy až po horní okraj.

**TMB-Complete** – pipetovací vaničku pro TMB-Complete nepoužívejte pro jiné roztoky. Zbytek roztoku z pipetovací vaničky nevracejte zpět do lahvičky.

Nereprodukovatelné výsledky mohou pocházet z metodických chyb, zejména:

- nedostatečné promíchání roztoků a vzorků před použitím
- záměna uzávěrů lahviček
- použití stejné špičky při pipetování různých roztoků
- vystavení reagensů nadměrné teplotě, bakteriální nebo chemické kontaminaci
- nedostatečné promytí jamek, neplnění jamek až po okraj, špatné odsátí zbytků roztoku
- znečištění okrajů jamek konjugátem nebo vzorky
- záměna reagensů z různých šarží souprav
- kontakt reagensů s oxidanty, těžkými kovy a jejich solemi.

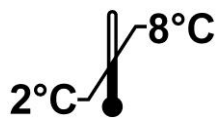
Soupravu je možno zpracovávat postupně. Pro přípravu pracovních roztoků odeberte jen takové množství reagensů, které bude spotřebováno pro analýzu.

Soupravu je možno zpracovat na všech typech automatických ELISA analyzátorů. V případě potřeby TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. nabízí certifikovanou modifikaci pracovního návodu pro konkrétní typ analyzátoru.

**Při nedodržení pracovního postupu výrobce neodpovídá za správnou funkci soupravy.**

## 14 Vysvětlení symbolů

---



Skladovací teplota

---



Udržovat v suchu

---



Použít do data

---



Číslo šarže

---



Výrobce

---



Čtěte návod k použití

---



Katalogové číslo

---



Počet testů

---

**GMP**

Správná výrobní praxe












---

Poznámky

**Poznámky**

**Poznámky**

## Schéma testu AD Ab ELISA

| Krok | Symbol  | Jednotlivé kroky testu  |
|------|---|---|
| 1    |    | Dávkování Ředícího roztoku vzorků<br>Blank 200 $\mu$ l<br>Další jamky 190 $\mu$ l |
| 2    |    | Dávkování neředěných kontrolních sér a vzorků 10 $\mu$ l<br>Mimo blank            |
| 3    |    | Inkubace 30 min při 37 °C   |
| 4    |    | Odsátí a promytí jamek 4 krát   |
| 5    |    | Dávkování Konjugátu 100 $\mu$ l<br>Včetně blanku                                  |
| 6    |   | Inkubace 30 min při 37 °C   |
| 7    |  | Odsátí a promytí jamek 4 krát   |
| 8    |  | Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 $\mu$ l<br>Včetně blanku                   |
| 9    |  | Inkubace 15 min při laboratorní teplotě.  |
| 10   |  | Dávkování Zastavovacího roztoku 100 $\mu$ l<br>Včetně blanku                      |
| 11   |  | Fotometrické měření při 450 nm  |