

Návod pro použití

Dog EIA Borrelia IgG/IgM

REF DBGM96



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
www.testlinecd.cz
www.testlinecd.com



OBSAH

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

Imunoenzymatická souprava ke stanovení IgG a IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v psím séru

1 Úvod

Lymeská borrelióza je infekční onemocnění vyvolané spirochetou *Borrelia burgdorferi* sensu lato, přenášené převážně klíšťaty rodu *Ixodes*. Borrelióza je rozšířena v Evropě, Americe i Asii.

Geneticky byla určena následující patogenní genospecies: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*.

Lymeská borrelióza je multisystémové onemocnění. Klinické příznaky u psů jsou teploty (v 50 % případů nemocných psů), nechutenství - anorexie (50 %), kulhání (48 %), únava a vysílení (29 %), bolesti (16 %), apatie (13 %), zánět kloubů - arthritida (13 %), hnisavé onemocnění kůže (4 %) a kožní erythema (4 %). Mezi další příznaky patří artrózy a ztuhlost kloubů, lymphocytosa, lymphadenopatie, glomerulonephritis, srdeční blok, agresivita.

Diagnostika onemocnění je založena na klinickém obrazu, epidemiologické anamnéze a laboratorních testech. V současné době je nejvhodnější laboratorní metodou screeningové stanovení hladiny specifických protilátek třídy IgG a IgM metodou ELISA. Diagnostiku komplikují velké rozdíly sérologické reaktivity různých jedinců a její možné ovlivnění předchozí aplikací antibiotik a vakcinací. Tvorba protilátek v časně fázi může být extrémně pomalá. Na druhé straně přetrvávání IgG i IgM protilátek po terapii nemusí znamenat selhání léčby.

2 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgG a IgM 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 psímu IgG a IgM konjugovaná křenuvou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických IgG nebo IgM protilátek přítomných ve vzorku.

Použitý antigen

Sonifikovaný celobuněčný antigen *Borrelia afzelii* s vysokým obsahem p83, p41 (flagelin), p39, OspA, OspC, p18 a p14

3 Složení soupravy

MICROPLATE	Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek v sáčku se sušidlem	1 ks
CONTROL -	Negativní kontrola Roztok neobsahující psí specifické protilátky, v pracovním ředění	1 x 2 ml
CONTROL +	Pozitivní kontrola Roztok obsahující psí specifické protilátky, v pracovním ředění	1 x 2 ml
CONJUGATE	Konjugát IgG (100× konc.) Roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti psímu IgG značený peroxidázou	1 x 0,15 ml
CONJUGATE	Konjugát IgM (100× konc.) Roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti psímu IgM značený peroxidázou	1 x 0,15 ml
DILUENT 2	Ředicí roztok vzorků 2 Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění	2 x 105 ml
CONJ. DILUENT 2	Ředicí roztok konjugátu 2 Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění	1 x 13 ml
SUBSTRATE 2	TMB-Complete 2 Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H ₂ O ₂ , v pracovním ředění	1 x 15 ml
WASH 20x	Promývací roztok 20krát koncentrovaný pufr	1 x 75 ml
STOP	Zastavovací roztok Roztok kyseliny, v pracovním ředění	1 x 15 ml
	Pracovní návod	1 ks

4 Další potřebné vybavení k manuálnímu provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety

Špičky pro jednorázové použití

Promývací zařízení

Stopky

Termostat na 37 °C

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 a citrátová plazma. Vzorky bakteriálně kontaminované, hemolytické nebo chylózní a antikoagulanty obsažené v plazmě (s výjimkou citrátu) mohou ovlivnit výsledek testu.

Vyšetřované vzorky je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 1 týden. Při delším skladování vzorky zmrazte na -20 °C. Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

6 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok ředte 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody). Např. 75 ml koncentrovaného Promývacího roztoku + 1425 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.

Kontroly (pozitivní a negativní) jsou v pracovním ředění, dále neředit!

Konjugáty ředte 1:101. Např. 55 µl Konjugátu + 5,5 ml Ředicího roztoku konjugátu (10 µl Konjugátu + 1 ml Ředicího roztoku konjugátu pro 8 jamek). Dobře promíchejte. Ředění provádějte bezprostředně před použitím!

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

Zaměnitelnost roztoků

Ředicí roztok vzorků, TMB-Complete a Aviditní roztok jsou v EIA soupravách TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. zaměnitelné, pokud mají stejné číselné označení (např. Ředicí roztok vzorků 2, Ředicí roztok vzorků 3, atd.). Zastavovací a Promývací roztok je univerzální ve všech soupravách.

7 Ředění vzorků

Ředící roztok vzorků před použitím šetrně promíchejte.

Ředění vzorků sér a plazem

Důkladně promíchané vzorky ředte 1:401 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 5 µl vzorku + 2 ml Ředícího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

8 Pracovní postup

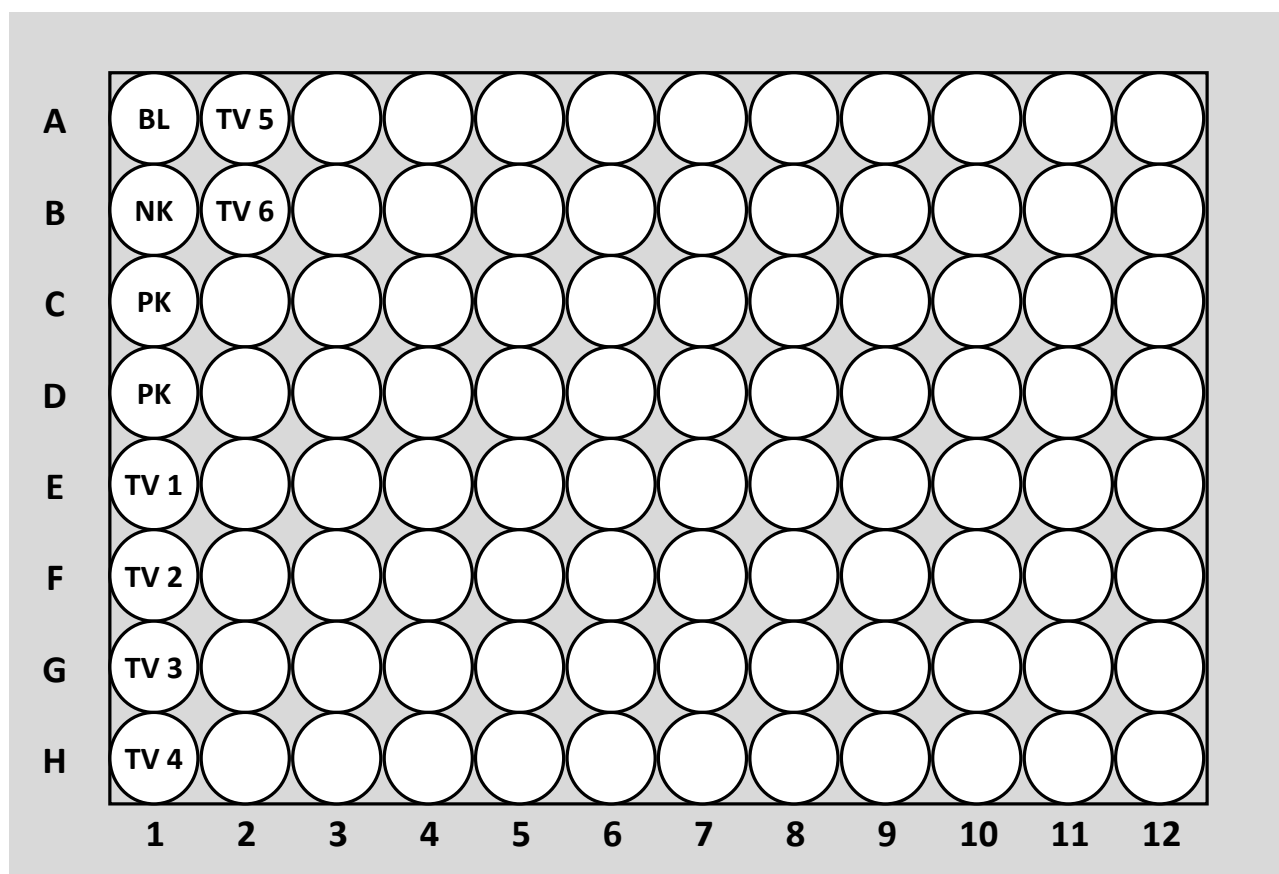
Všechny reagenty nechte vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchejte. Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

1. Dávkujte kontroly a ředěné vzorky podle pracovního schématu.
 - Jamku A1 ponechte prázdnou (blank).
 - Pipetujte 100 µl Negativní kontroly do 1 jamky.
 - Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly do 2 jamek.
 - Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění (viz kapitola Ředění vzorků) do zbývajících jamek.
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
3. Odsajte obsah jamek a 5 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
4. Dávkujte do všech jamek kromě A1 100 µl Konjugátu v odpovídajícím ředění (viz 6 Příprava pracovních roztoků).
5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
6. Odsajte obsah jamek a 5 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 10 minut při laboratorní teplotě v temnu.
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 minut po zastavení reakce. Před měřením důkladně očistěte dna jamek.

V případě celkově slabší reakce, způsobené např. nižší laboratorní teplotou, je možné prodloužit inkubaci se substrátem až na 20 min. Zastavení části jamek pro vyšetření IgG nebo IgM se může lišit.

Složení soupravy umožňuje celou mikrotitrační destičku využít i pro detekci protilátek pouze jedné třídy.

9 Pracovní schéma



BL Blank (prázdná jamka)

PK 100 μ l

CONTROL	+
---------	---

NK 100 μ l

CONTROL	-
---------	---

TV 1-x 100 μ l ředěného testovaného vzorku

10 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Absorbance blanku je menší než 0,150.

$$\text{BLANK} < 0,150$$

Absorbance Negativní kontroly je menší než 0,200

$$\boxed{\text{CONTROL}} \text{ - } < 0,200$$

Absorbance Pozitivní kontroly ve třídě IgG je větší než 0,500.

$$\boxed{\text{CONTROL}} \text{ + } > 0,500$$

Absorbance Pozitivní kontroly ve třídě IgM je větší než 0,300.

$$\boxed{\text{CONTROL}} \text{ + } > 0,300$$

11 Hodnocení výsledků

Výpočet Indexu positivity (IP)

Vypočtete hranici positivity násobením průměrné absorbance Pozitivní kontroly faktorem této třídy vyšetření.

Faktor IgG 0,18

Faktor IgM 0,32

$$\text{HP} = \text{Průměrná absorbance PK} \times \text{FAKTOR}$$

Vypočtete Index positivity dělením absorbance testovaného vzorku hranicí positivity vypočtené pro tutéž třídu vyšetření:

$$\text{IP} = \frac{\text{Absorbance vzorků}}{\text{HP}}$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 1).

Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,85	negativní
0,85 až 1,15	hraniční
větší než 1,15	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem pozitivity 0,85 až 1,15 je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění.

Sérologický nález je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

12 Bezpečnost práce

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro.

Séra použitá při výrobě kontrol byla vyšetřena na HIV 1 a HIV 2, HBsAg, HCV, TPHA s negativním výsledkem. Přesto je třeba s nimi pracovat jako s potenciálně infekčním materiálem.

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 plazmu nebo klinický vzorek, 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 použijte vysoce kvalitní destilovanou vodu.

Promývání – dodržujte předepsaný počet promývacích cyklů a jamky plňte vždy až po horní okraj. Doba, po kterou zůstávají jamky naplněny promývacím roztokem mezi promývacími cykly (soak time), by měla být asi 30-60 sekund.

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:

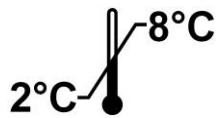
- nedostatečné promíchání roztoků a vzorků před použitím
- záměna uzávěrů lahviček
- použití stejné špičky při pipetování různých roztoků
- vystavení reagensů nadměrné teplotě, bakteriální nebo chemické kontaminaci
- nedostatečné promytí jamek, neplnění jamek až po okraj, špatné odsátí zbytků roztoku
- 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

Schéma testu Dog EIA Borrelia IgG/IgM

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Ředění vzorků séra/plazmy 1:401 (5 µl + 2 ml)
2		Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl Blank = prázdná jamka
3		Inkubace 30 min při 37 °C
4		Odsátí a promytí jamek 5 krát
5		Ředění Konjugátu 1:101 (10 µl + 1 ml)
6		Dávkování Konjugátu 100 µl Blank = prázdná jamka
7		Inkubace 30 min při 37 °C
8		Odsátí a promytí jamek 5 krát
9		Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl Včetně blanku
10		Inkubace 10 min při laboratorní teplotě
11		Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl Včetně blanku
12		Fotometrické měření při 450 nm