

## Návod pro použití

# IPNV Ag ELISA

**REF** IPN096



Souprava pro profesionální použití

## 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](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>Příprava vzorků .....</b>	<b>6</b>
<b>8</b>	<b>Pracovní postup .....</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>Pracovní schéma .....</b>	<b>7</b>
<b>10</b>	<b>Validita testu.....</b>	<b>8</b>
<b>11</b>	<b>Hodnocení výsledků .....</b>	<b>8</b>
<b>12</b>	<b>Bezpečnost práce .....</b>	<b>8</b>
<b>13</b>	<b>Technické připomínky .....</b>	<b>9</b>
<b>14</b>	<b>Vysvětlení symbolů .....</b>	<b>10</b>

# Imunoenzymatická souprava k průkazu antigenu viru infekční nekrózy pankreatu lososovitých ryb v orgánových homogenátech a kultivačních médiích infikovaných buněčných kultur

---

## 1 Úvod

Virus infekční nekrózy pankreatu (IPNV) lososovitých ryb patří do čeledi *Birnaviridae*. K onemocnění jsou vnímavé především ryby z čeledi lososovitých, ale i další druhy mořských ryb a korýšů.

Mezi klinické příznaky řadíme: exophthalmus, zvětšení břišní dutiny, léze a vředy na pankreatu, krvácivé změny na kůži, žaludek a střeva s obsahem mléčně zakaleného hlenu. Ryby mají tmavě pigmentovanou kůži, objevují se poruchy plavání (polehávání na boku u dna) a ztráta reflexů.

Diagnostika je založena na průkazu antigenu IPNV v orgánových homogenátech i v kultivačních médiích infikovaných buněčných kultur. Citlivost ELISA metody ( $10^2$  TCID<sub>50</sub> na 0,1 ml vyšetřované tekutiny) je dostatečná pro rutinní vyšetření terénních vzorků. Bakteriální a plísňová kontaminace vzorků odebraných od uhynulých ryb neovlivňuje výsledky vyšetření tímto testem. Přesto je třeba dávat přednost vyšetření čerstvě odebraných vzorků.

## 2 Princip testu

Souprava umožňuje detekci virového antigenu ve vzorku metodou EIA, typ sandwich (tj. pevná fáze s navázanou specifickou protilátkou - antigen vyšetřovaného vzorku – králičí protilátka proti antigenu z vyšetřovaného vzorku – značená protilátka). Značená protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti králičímu 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 zbarvení na žluté. Intenzita žlutého zbarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci antigenu přítomného ve vzorku.

### 3 Složení soupravy

MICROPLATE	<b>Potažená destička</b> s navázanou specifickou protilátkou, 12 × 8 jamek v sáčku se sušidlem	1 ks
ANTIGEN -	<b>Negativní antigen</b> Roztok neobsahující specifický antigen, v pracovním ředění	1 × 0,7 ml
ANTIGEN +	<b>Pozitivní antigen</b> Roztok obsahující specifický antigen, v pracovním ředění	1 × 0,7 ml
RAIPNV	<b>RAIPNV</b> Králičí sérum s protilátkou proti IPNV, v pracovním ředění	1 × 6,0 ml
CONJUGATE	<b>Konjugát</b> Roztok obsahující prasečí imunoglobulin proti králičímu IgG značený peroxidázou, v pracovním ředění	1 × 12 ml
SUBSTRATE 5	<b>TMB-Complete 5</b> Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , v pracovním ředění	1 × 15 ml
WASH 20x	<b>Promývací roztok</b> 20krát koncentrovaný pufr	1 × 20 ml
STOP	<b>Zastavovací roztok</b> Roztok kyseliny, v pracovním ředění	1 × 12 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 vzorky lze použít homogenizované rybí orgány, rybí plůdky nebo kultivační média virem infikovaných buněčných kultur. Homogenáty se uchovávají při teplotě -20 °C.

## 6 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok ředte 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody). Např. 20 ml koncentrovaného Promývacího roztoku + 380 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.

Negativní a Pozitivní antigen je v pracovním ředění, dále neředit!

RAIPNV je v pracovním ředění, dále neředit!

Konjugát je v pracovním ředění, dále neředit!

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

### Zaměnitelnost roztoků

TMB-Complete je v EIA soupravách TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. zaměnitelný, pokud má stejné číselné označení (např. TMB-Complete 1, TMB-Complete 2 atd.). Promývací a Zastavovací roztok je univerzální ve všech soupravách.

## 7 Příprava vzorků

Orgány (ledviny, slezina atd.) nebo celý trup (plůdek o délce méně než 5 cm) se homogenizují v 3-5 objemech pufovaného fyziologického roztoku (PBS) a do vyšetření se uchovávají při teplotě -20 °C. Před použitím se homogenáty centrifugují 5 minut (2000 ot/min) a získané supernatanty se použijí k vyšetření.

Kultivační média buněčných kultur infikovaných virem se vyšetřují přímo po odstranění buněčného detritu centrifugací.

## 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 kontrolní antigeny a vzorky podle pracovního schématu.

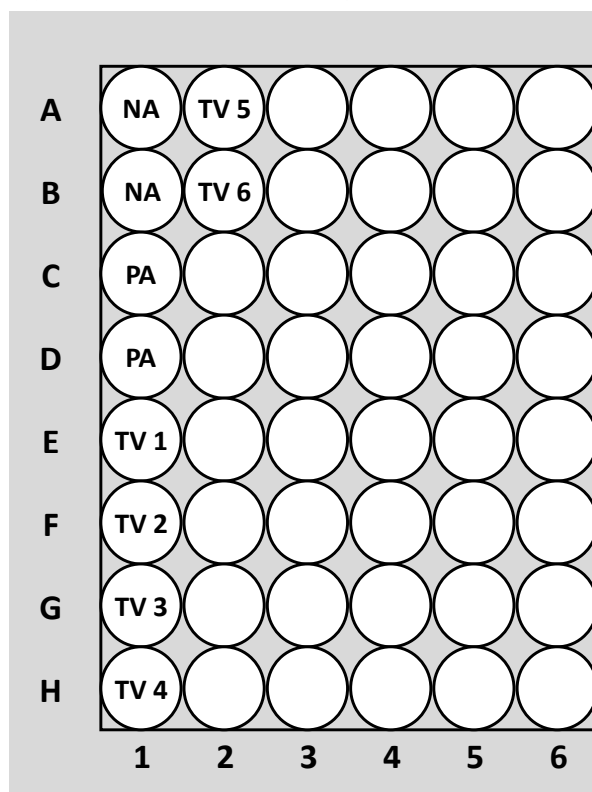
### Vyhledávací (screeningové) vyšetření

- Pipetujte 50 µl RAIPNV do všech jamek.
  - Pipetujte 50 µl kontrolního Negativního antigenu do 2 jamek (A1, B1).
  - Pipetujte 50 µl kontrolního Pozitivního antigenu do 2 jamek (C1, D1).
  - Pipetujte 50 µl testovacích vzorků do zbývajících jamek (E1 – H12).
  - Obsah jamek důkladně promíchejte.
  - Titrační vyšetření
  - Pipetujte 50 µl RAIPNV do všech jamek
  - Pipetujte 50 µl testovaných vzorků do jamek řady A, obsah jamek důkladně promíchejte.
  - Přenášejte postupně 50 µl z jamek řady A do jamek řady H (ředění 1:2 až 1:256).
  - Při každém vyšetření zařaďte 2 jamky s kontrolním Negativním antigenem a 2 jamky s kontrolním Pozitivním antigenem.
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte ve vlhké komůrce 60 minut při 37 °C nebo přes noc (14 –18 hod.) při +2 °C až +8 °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 Konjugátu.
5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce.
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. Dávkuje do všech jamek 100  $\mu$ l jednosložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečištění – viz kapitola Technické připomínky.
  8. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 10 minut při laboratorní teplotě v temnu. Sledujte pozorně vývoj modrého zbarvení, zejména v jamkách s kontrolním Pozitivním antigenem.
  9. Zastavte reakci přidáním 100  $\mu$ l 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 10 minut po zastavení reakce.
- V případě celkově slabší reakce, způsobené např. nižší laboratorní teplotou, je možné prodloužit inkubaci se substrátem až na 30 minut.

## 9 Pracovní schéma

Vyhledávací (screeningové) stanovení

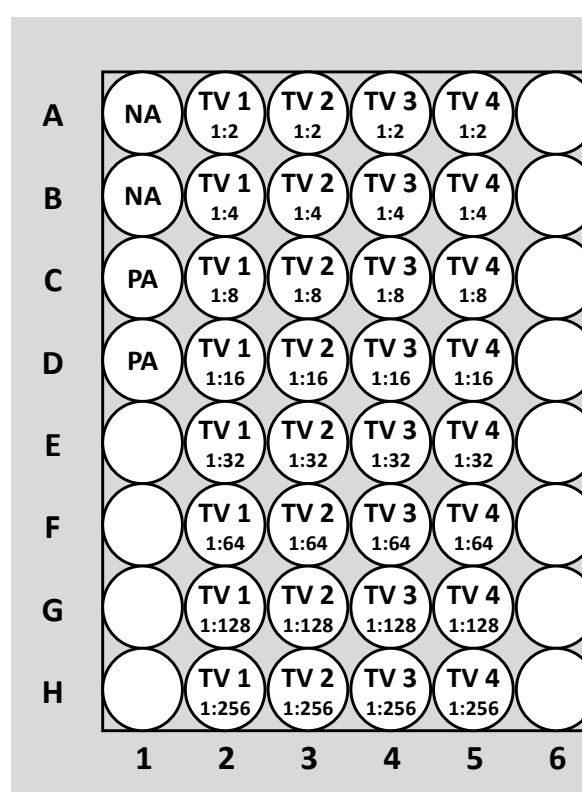


NA

PA

TV 1-x Testované vzorky

titrační vyšetření



NA

PA

TV 1-x Testované vzorky v daných titrech

## 10 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Průměrná absorbance v jamkách s Negativním antigenem je menší než 0,350.

$$\boxed{\text{ANTIGEN}} \mid - < 0,350$$

Průměrná absorbance v jamkách s Pozitivním antigenem je větší než 0,500.

$$\boxed{\text{ANTIGEN}} \mid + > 0,500$$

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

## 11 Hodnocení výsledků

### Pozitivní výsledek

Hodnoťte výsledek jako pozitivní, je-li hodnota absorbance testovaného vzorku snižena o průměrnou absorbanci Negativního antigenu:

- Při hodinové inkubaci se vzorky rovna nebo větší než 0,200.
- Při prodloužené inkubaci se vzorky rovna nebo větší než 0,300.
- ELISA titr antigenu je poslední ředění vzorku, při kterém je hodnota absorbance testovaného vzorku snižena o průměrnou absorbanci Negativního antigenu rovna nebo větší než 0,200.

## 12 Bezpečnost práce

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro.

Kontrolní antigeny, králíčí sérum s protilátkou, konjugát a veškerý materiál přicházející do styku s vyšetřovanými vzorky je nutno považovat za potenciálně infekční.

Některé reagensie 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.

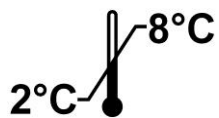
Soupravu je možno zpracovávat postupně. Pro přípravu pracovních roztoků odeberte jen takové množství reagensů, které bude spotřebováno pro analýzu.

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**

## Schéma testu IPNV Ag ELISA

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Screeningové vyšetření: Dávkování RAIPNV 50 µl Titrační vyšetření: Dávkování RAIPNV 50 µl
2		Screeningové vyšetření: Dávkování antigenů 50 µl Titrační vyšetření: Dávkování antigenů 50 µl
3		Screeningové vyšetření: Dávkování vzorků 50 µl Titrační vyšetření: Dávkování vzorků 50 µl do řady A, přenést postupně 50 µl z jamek řady A do jamek řady H (1:2 až 1:256)
4		Inkubace <ul style="list-style-type: none"> <li>• 60 min při 37 °C</li> <li>• přes noc (14-18 hodin) při +2 °C až +8 °C</li> </ul>
5		Odsátí a promytí jamek 4 krát
6		Dávkování Konjugátu 100 µl
7		Inkubace 60 min při 37 °C
8		Odsátí a promytí jamek 4 krát
9		Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl
10		Inkubace 10 min při laboratorní teplotě
11		Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl
12		Fotometrické měření při 450 nm