



## Návod pro použití

# PTB Ab ELISA 480

**REF** PTB480



**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>Určený účel použití.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Princip testu.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Složení soupravy .....</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Další potřebné vybavení k provedení testu .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Skladování a expirace soupravy .....</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>Příprava pracovních roztoků.....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>Ředění vzorků a kontrolních sér .....</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>Pracovní postup .....</b>	<b>6</b>
<b>10</b>	<b>Pracovní schéma .....</b>	<b>9</b>
<b>11</b>	<b>Validita testu.....</b>	<b>10</b>
<b>12</b>	<b>Hodnocení výsledků .....</b>	<b>10</b>
<b>13</b>	<b>Charakteristiky soupravy.....</b>	<b>11</b>
<b>14</b>	<b>Bezpečnost práce .....</b>	<b>12</b>
<b>15</b>	<b>Technické připomínky .....</b>	<b>13</b>
<b>16</b>	<b>Vysvětlení symbolů .....</b>	<b>14</b>

## 1 Určený účel použití

Imunoenzymatická souprava pro screeningové stanovení protilátek proti *Mycobacterium paratuberculosis* v hovězím séru, plazmě a mléku.

## 2 Úvod

Paratuberkulóza (Johne's diseases) je ekonomicky nákladné onemocnění domácích přežvýkavců (způsobované *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*; MAP) Původce vyvolává neléčitelné onemocnění skotu s velmi dlouhou inkubační dobou 2 a více let. Základním klinickým příznakem je vodnatý průjem s intenzivním hubnutím při zachovaném příjmu potravy. Zvíře hyne v pokročilé fázi onemocnění na vyčerpání. V průběhu vylučování MAP v klinickém stádiu onemocnění zvířata začnou tvořit protilátky proti původci onemocnění. Tyto protilátky však křížově reagují s jinými mykobaktériemi. Tyto křížově reagující protilátky musí být odstraněny absorpcí séra/plazmy a mléka s *M. phlei* před provedením testu.

## 3 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 hovězímu 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 specifických protilátek přítomných ve vzorku.

### Použitý antigen

Purifikovaný a inaktivovaný sekreční antigen *M. avium spp. paratuberculosis*.

#### 4 Složení soupravy

MICROPLATE	<b>Potažená destička</b> s navázaným antigenem, 12 × 8 jamek v sáčku se sušidlem	5 ks
NCS	<b>Negativní kontrolní sérum</b> 12krát koncentrované hovězí sérum neobsahující specifické protilátky	1 × 0,4 ml
PCS-L	<b>Pozitivní kontrolní sérum limitní</b> 12krát koncentrované hovězí sérum obsahující specifické protilátky	1 × 0,4 ml
CONJUGATE	<b>Konjugát</b> 100krát koncentrované kozí nebo králičí protilátky proti hovězímu imunoglobulinu značené peroxidázou	1 × 0,8 ml
DILUENT 14	<b>Ředící roztok vzorků 14 (zelený)</b> Pufr se stabilizátory bílkovin a extraktem <i>M. phlei</i> , v pracovním ředění	1 × 60 ml
CONJ. DILUENT 16	<b>Ředící roztok konjugátu 16 (modrý)</b> Pufr se stabilizátory konjugátu, v pracovním ředění	1 × 60 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 × 60 ml
WASH 20x	<b>Promývací roztok</b> 20krát koncentrovaný pufr	2 × 60 ml
STOP	<b>Zastavovací roztok</b> Roztok kyseliny, v pracovním ředění	1 × 60 ml
	<b>Pracovní návod</b>	1 ks

## 5 Další potřebné vybavení k provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety

Špičky pro jednorázové použití

Mikrotitrační destičky

Promývací zařízení

Stopky

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

Fotometr pro mikrotitrační destičky

## 6 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 krevní sérum, plazma a vzorky mléka (individuální, směsné a bazénové). Vyšetřované vzorky (sérum, plazma, mléko) je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 48 hodin.

Vzorky mléka mohou být konzervovány např. Bronopolem, BSM tablety. Takto konzervované vzorky mléka je možné skladovat při +2 °C až +8 °C maximálně 6 dnů.

Při delším skladování vzorky zmrazte na -20 °C.

## 7 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 již v pracovní koncentraci, dále neředit!

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

Konjugát ředte 1:100 Ředícím roztokem konjugátu. Např. 100 µl Konjugátu doplňte Ředícím roztokem konjugátu do celkového objemu 10 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

TMB-Complete je v EIA soupravách TestLine zaměnitelný, pokud má stejné číselné označení. Promývací a Zastavovací roztok je univerzální ve všech EIA soupravách TestLine.

## 8 Ředění vzorků a kontrolních sér

Ředící roztok vzorků před použitím šetrně promíchejte.

### Ředění vzorků a kontrolních sér

Důkladně promíchané vzorky a kontrolní séra (PKS-L a NKS) ředíte 1:12 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 10 µl vzorku (kontrolního séra) + 110 µl Ředícího roztoku vzorků.

Ředění provádějte v jamkách čisté mikrotitrační destičky – není součástí soupravy (viz kapitola Pracovní postup). Dobře promíchejte.

Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

### Příprava vzorků mléka

Vzorky mléka se centrifugují nebo nechají sednout tak, že se tuk oddělí od mléčného séra (tuk nahoře, sérum dole). Při pipetování zaveďte špičku pod tuk, vyšetřuje se mléčné sérum.

Vzorky mléka (individuální, směsné a bazénové) se vyšetřují ředěné 1:2 Ředícím roztokem vzorků (např. 60 µl + 60 µl)

## 9 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 vzorky podle pracovního schématu. Vzorky se pre-inkubují v nepotažené čisté mikrotitrační destičce.

### Vzorky séra nebo plazmy

- Pipetujte 10 µl Negativního kontrolního séra do 2 jamek (A1, B1).
- Pipetujte 10 µl Pozitivního kontrolního séra limitního do 2 jamek (C1, D1).
- Pipetujte 10 µl testovaných vzorků do zbývajících jamek dle pracovního schématu.
- Pipetujte do všech jamek 110 µl Ředícího roztoku vzorku (zelený roztok).
- Obsah jamek důkladně promíchejte (nejlépe za použití třepačky mikrotitračních destiček).
- Postup může být i opačný tzn. napipetovat Ředící roztok vzorků a následně kontrolní séra a vzorky.

### Vzorky mléka

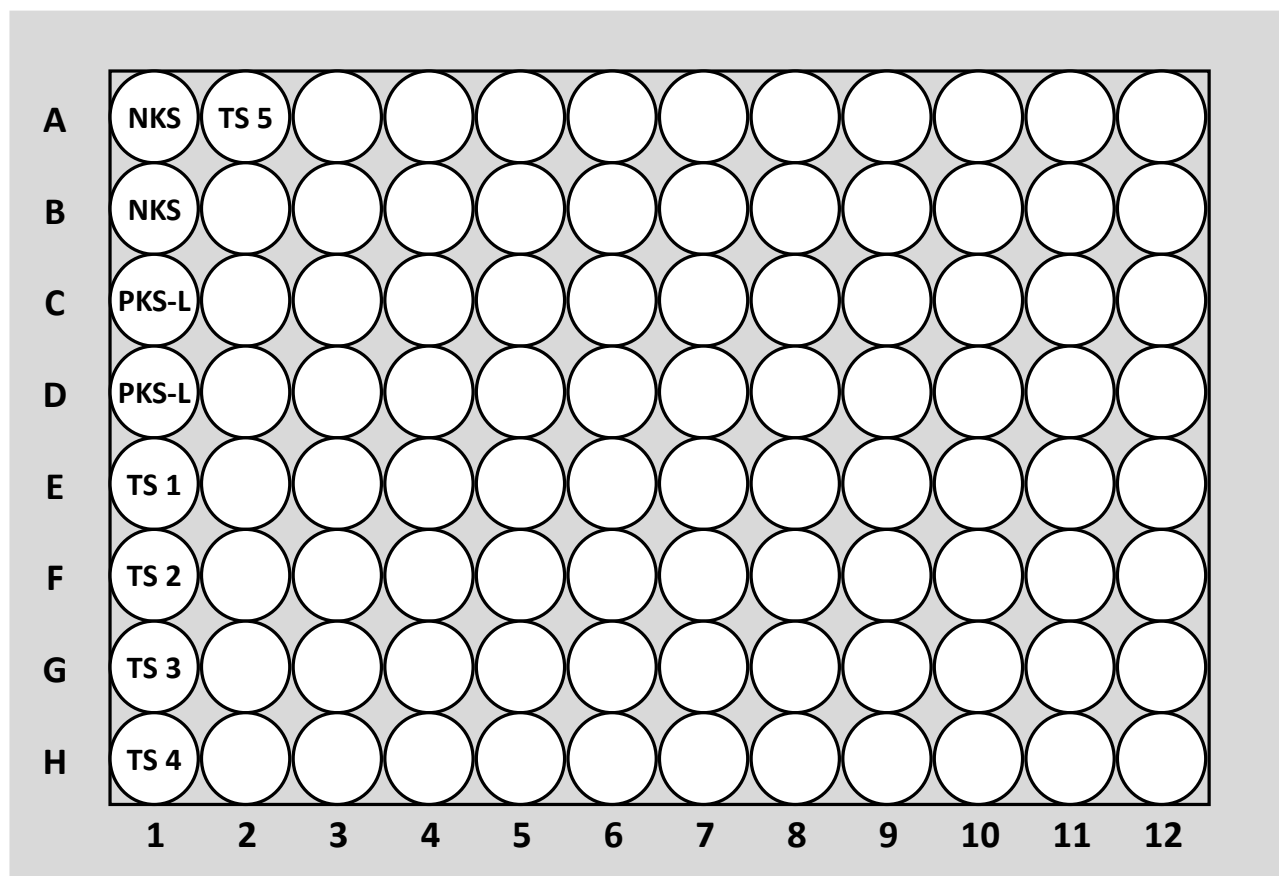
- Pipetujte 10 µl Negativního kontrolního séra do 2 jamek (A1, B1).
  - Pipetujte 10 µl Pozitivního kontrolního séra limitního do 2 jamek (C1, D1).
  - Pipetujte 60 µl testovaných vzorků mléka do zbývajících jamek dle pracovního schématu.
  - Pipetujte do jamek s kontrolními séry 110 µl Ředícího roztoku vzorků (zelený roztok)
  - Pipetujte do jamek se vzorky mléka 60 µl Ředícího roztoku vzorků (zelený roztok).
  - Obsah jamek důkladně promíchejte (nejlépe za použití třepačky mikrotitračních destiček).
2. Inkubujte destičky 5 – 45 minut při 21 °C (±5 °C).
  3. Pipetujte 100 µl naředěných vzorků a kontrolních sér na destičku potaženou antigenem.
  4. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 21 °C (±5 °C).
  5. Odsajte obsah jamek a 4 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu. Dbejte na to, aby byly jamky se vzorky mléka důkladně promyty (v jamce nesmí zůstat tukový kroužek).
  6. Dávkujte do všech jamek 100 µl pracovního roztoku konjugátu.
  7. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 21 °C (±5 °C).
  8. Odsajte obsah jamek a 4 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.

9. Dávkujte do všech jamek 100  $\mu$ l jednosložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečištění – viz kapitola Technické připomínky.
10. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 15 minut při 21 °C ( $\pm$ 5 °C). Sledujte pozorně vývoj modrého zbarvení, zejména v jamkách s pozitivním kontrolním sérem limitním.
11. Zastavte reakci přidáním 100  $\mu$ l Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
12. Změřte na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků 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. Zastavte reakci v okamžiku, kdy intenzita zbarvení PKS-L odpovídá 0,350 - 2,000.



## 10 Pracovní schéma



## Vyšetření séra

NKS	100 $\mu$ l	ředěného	NCS
PKS-L	100 $\mu$ l	ředěného	PCS-L
TS 1-x	100 $\mu$ l	ředěného testovaného séra	

## Vyšetření mléka

NKS	100 $\mu$ l	ředěného	NCS
PKS-L	100 $\mu$ l	ředěného	PCS-L
TS 1-x	100 $\mu$ l	testovaného vzorku mléka	

## 11 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Absorbance Pozitivního kontrolního séra limitního je  $> 0,350$ .

$$0,350 < \boxed{\text{PCS-L}}$$

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

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

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

## 12 Hodnocení výsledků

Výpočet poměru S/P

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

Interpretace výsledků vyšetření sér uvádí tabulka (Tabulka 1).

**Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření sér**

Poměr S/P [%]	Hodnocení
menší než 60	negativní
60 až 70	hraniční
větší než 70	pozitivní

V případě hraničního výsledku se doporučuje vyšetření opakovat z nového odběru

Interpretace výsledků vyšetření vzorku mlék uvádějí tabulky (Tabulka 2 a Tabulka 3).

**Tabulka 2 Interpretace výsledků individuálních vzorků mléka**

Poměr S/P [%]	Hodnocení
menší než 30	negativní
větší nebo rovno 30	pozitivní

**Tabulka 3 Interpretace výsledků směsných a bazénových vzorků mléka**

Poměr S/P [%]	Hodnocení
menší než 15	negativní
větší nebo rovno 15	pozitivní

## 13 Charakteristiky soupravy

### 13.1 Specifita a citlivost

Diagnostická specifita byla stanovena na panelu negativních sér, počet testovaných sér byl 162. Diagnostická citlivost byla stanovena na panelu pozitivních sér, počet testovaných sér byl 136. Specifita a citlivost vycházejí ze zjištěných výsledků.

**Specifita: 99,38 %**

**Citlivost: 99,26 %**

### 13.2 Opakovatelnost

**Vnitřní opakovatelnost – Intra-assay** byla stanovena testováním vzorků různých úrovní reaktivity protilátek s alespoň 16ti opakováními v jednom testu. Variační koeficient (CV) reaktivních vzorků byl **6,59 %**.

**Vnější opakovatelnost – Inter-assay** byla stanovena testováním vzorků různých úrovní reaktivity protilátek v 40ti různých testovacích cyklech. CV reaktivních vzorků byl **3,90 %**.

## 14 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.

## 15 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.

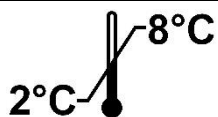
Soupravu je možno zpracovávat postupně. Pro přípravu pracovních roztoků odeberte jen takové množství reagensů, které bude spotřebováno pro analýzu.

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.**

## 16 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 PTB Ab ELISA 480

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Ředění vzorků a kontrolních sér Séra/plazmy/kontrolní séra: 1:12 (10 µl + 110 µl) Mléko: 1:2 (60 µl + 60 µl)
2		Inkubace 5 - 45 min při 21 °C
3		Dávkování ředěných kontrolních sér a vzorků 100 µl
4		Inkubace 30 min při 21 °C
5		Odsátí a promytí jamek 4krát
6		Dávkování Konjugátu 100 µl
7		Inkubace 30 min při 21 °C
8		Odsátí a promytí jamek 4krát
9		Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl
10		Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
11		Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl
12		Fotometrické měření při 450 nm