

**Serologická diagnostika  
specifických protilátek proti  
Bovinnímu herpesviru 1 metodou ELISA  
480 nebo 1920 reakcí**

Cattletype BHV1 gB Ab

Verze 090724

kat. číslo: 03-101/5 (5 x 96 testů)

03-101/20 (20 x 96 testů)

## **Návod k použití**

**Diagnostikum in vitro pro vzorky skotu**

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1. POUŽITÍ.....  | 3  |
| 2. VŠEOBECNÉ INFORMACE .....   | 3  |
| 3. POPIS A PRINCIP TESTU .....   | 3  |
| 4. REAGENCIE .....   | 4  |
| 5. POŽADOVANÝ MATERIÁL NUTNÝ K VYŠETŘENÍ, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY ..... | 5  |
| 6. SKLADOVÁNÍ , OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ.....                                     | 5  |
| 7. NÁVOD K POUŽITÍ.....  | 6  |
| 8. VALIDAČNÍ KRITÉRIA .....  | 9  |
| 9. KALKULACE.....  | 9  |
| 10. INTERPRETACE .....   | 9  |
| 11. LIKVIDACE SOUPRAVY.....  | 10 |

## 1. Použití

CATTLETYPE® BHV1 gB je kompetitivní ELISA v mikrodestičkovém formátu. Je určena k detekci protilátek proti glykoproteinu B Bovinního herpesviru 1 (BHV1) ve vzorcích séra, plasmy a mléka skotu. Pokud se použije pro přípravu vzorku CATTLETYPE® MILK PREP, pak je možno vyšetřit i směsné vzorky mléka (poolové) zahrnující až 50 individuálních vzorků.

## 2. Všeobecné informace

Bovinní herpesvirus 1 způsobuje onemocnění Infekční bovinní rhinotracheitis (IBR) a respirační onemocnění projevující se tracheitidou, rhinitidou a horečkou. Navíc infekce BHV1 může být příčinou Infekční pustulární vulvovaginitidy (IPV), balanopostitidy a abortů. Klinické stadium onemocnění často přechází v latentní infekci BHV1. Reaktivace viru může být příčinou rozšíření infekce ve stádě. CATTLETYPE® BHV1 gB Ab ELISA umožňuje detekci protilátek proti BHV1 ze vzorků séra, plasmy a mléka skotu infikovaného BHV1 nebo vakcinovaného vakcinou obsahujícím glykoprotein B (gB).

## 3. Popis a princip testu

CATTLETYPE® BHV1 gB Ab je kompetitivní ELISA. Testovací destička je potažena inaktivovaným antigenem BHV1. Během inkubace vzorku se na antigen pevně naváže specifické protilátky proti BHV1, nenavázaný materiál je odstraněn následným promývacím krokem. Dále se přidá HRP značená specifická monoklonální gB protilátka, která se nemůže navázat na BHV1 antigen, pokud byl již obsazen v předešlém kroku protilátkou ze vzorku. Nenavázaný anti-gB-HRP konjugát je odstraněn opětovným promýváním. Rozvoj barevné reakce je zahájen přidáním substrátového roztoku a je po 10 minutách ukončen. Optická densita (OD) se měří na spektrofotometru. Hodnota blokování (procentuální inhibice) se vypočítá ze získaných hodnot OD testovaného vzorku a negativní kontroly, která neobsahuje žádné specifické BHV1 protilátky.

### Informace pro objednání :

|                        |               |                     |
|------------------------|---------------|---------------------|
| CATTLETYPE® BHV1 gB Ab | 5 x 96 testů  | kat.číslo 03-101/5  |
|                        | 20 x 96 testů | kat.číslo 03-101/20 |

## 4. Reagencie

|   | 5-ti<br>destič-<br>kový<br>kit | 20-ti<br>destičkový<br>kit |
|---|--------------------------------|----------------------------|
| testovací mikrotitrační destičky potažené s BHV1 antigenem s 12 stripy po 8 jamkách   | 5                              | 0                          |
| Testovací mikrotitrační destičky potažené s BHV1 antigenem nedělené s 96 jamkami  | 0                              | 20                         |
| koncentrovaný vymývací roztok (10x) obsahující Tween a konzervans   | 3 x<br>125<br>ml               | 1,0 litr                   |
| ředidlo vzorku obsahující Tween a konzervans, připravené k použití  | 30<br>ml                       | 125 ml                     |
| pozitivní kontrola (reagující hovězí sérum s BHV1 v pufru se stabilizátory bílkovin a konzervantem)   | 3,5<br>ml                      | 2 x 3,5<br>ml              |
| negativní kontrola (nereagující hovězí sérum s BHV1 v pufru se stabilizátory bílkovin a konzervantem)   | 3,5<br>ml                      | 2 x 3,5<br>ml              |
| Anti-gB-HRP konjugát se značenými gB specifickými monoklonálními protilátkami peroxidázou z křenu se stabilizátory bílkovin a konzervantem připravené k použití | 60<br>ml                       | 240 ml                     |
| Substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin) připravený k použití   | 60<br>ml                       | 240 ml                     |
| Stop roztok - 0,5ml kyselina sírová, připravená k použití, <b>nebezpečné!</b>   | 60<br>ml                       | 240 ml                     |

## 5. Požadovaný materiál nutný k vyšetření, který není součástí soupravy

1. kádinky
2. odměrné válce
3. analytické pipety
4. multikanálové pipety
5. jednorázové špičky na mikropipety
6. žlábek pro nasávání roztoků do mikropipety
7. víčka (hliníková nebo adhesivní folie pro zakrytí testovacích destiček)
8. zařízení pro dávkování a vysávání promývacího roztoku
9. spektrofotometr pro mikrodestičky
10. destilovaná voda.

## 6. Skladování, opatření a varování

Reagencie skladujte při teplotě +2°C až +8°C a těsně před použitím je přeneste do pokojové teploty (18°C až 25°C). Lahvičky s koncentrovaným vymývacím roztokem (10x - lahvička 2) a Stop roztokem (lahvička 8) mohou být skladovány při pokojové teplotě (18°C až 25°C). Promývací roztok (naředěný koncentrovaný vymývací roztok) může být skladován maximálně 24 hod při pokojové teplotě (18°C až 25°C) nebo 1 týden při teplotě +2°C až +8°C. Zbývající testovací stripy skladujte do příštího použití opětovně zabalené do plastové folie s desikantem při +2°C až +8°C. Testovací stripy mohou být skladovány nejméně 6 týdnů po otevření originálně zabalené testovací destičky.

Testování by měl provádět kvalifikovaný personál pro práci v laboratoři. Substrátový roztok TMB skladujte ve tmě a nevystavujte ho během provádění testování intenzivnímu světlu nebo slunečnímu záření. Jednotlivé reagencie testovací soupravy nemohou být kontaminovány nebo míchány s komponenty jiných šarží. Nepoužívejte komponenty testovací soupravy po uplynutí data expirace.

Pro ředění koncentrovaného vymývacího roztoku (10x) používejte destilovanou nebo deionizovanou vodu. Pokud by použitá voda nebyla dostatečně čistá mohlo by to interferovat analýzu. Doporučujeme použít 2x destilovanou vodu nebo vysoce přečištěnou vodu (Milli-Q).

K zaručení přesných výsledků je absolutně základní dodržet tento návod k použití soupravy ELISA. Dále je nutné používat čistou skleněnou aparaturu, pipetovat opatrně a důsledně promývání během testování. V neposlední řadě striktně dodržujte zachování uvedených inkubačních časů.

***Stop roztok obsahuje 2,5% kyseliny sírovou – Pozor !***

Všechny zbytky vzorků a věci, které přišly do kontraktu se vzorky musí být dekontaminovány nebo s nimi musí být zacházeno jako s potenciálně infekčním materiálem.

## 7. Návod k použití

### 7.1. Příprava reagensů

#### Promývací roztok

Koncentrovaný vymývací roztok (10x) zředte 1 ku 10 s destilovanou vodou. Např. pro jednu testovací destičku zředte 50 ml koncentrovaného vymývacího roztoku (10 x) ve 450 ml destilované vody a výsledný promývací roztok řádně promíchejte.

#### Sérum a plasma:

Sérum nebo plasmu můžete použít čerstvé, chlazené nebo po předešlém zamražení. Dejte pozor, abyste měnili jednorázové špičky pipet po každém vzorku!

#### Mléko:

Vzorky mléka musí být před testováním odtučněny. Centrifugujte celé vzorky mléka po dobu 10 min při 3000 g při 10°C nebo uskladněte vzorky mléka přes noc při +2 až +8°C. Pak odstraňte smetanu. Dejte pozor, abyste měnili jednorázové špičky pipet po každém vzorku!

### 7.2. Postup testování vzorků séra a plasmy

1. Všechny reagensie před použitím přeneste do pokojové teploty 18 až 25°C a jemně je promíchejte vířením.

## Schéma 1 - rozdělení vzorků a kontrol na mikrodestičku - testovací protokol

Doporučená šablona pro CATTLETYPE® BHV1 gB Ab ELISA

NC = negativní kontrola

PC = pozitivní kontrola

S1 = vzorek č. 1

S2 = vzorek č. 2

S3 = .....

|   |        |        |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
|---|--------|--------|--|--|--|--|--|--|--|---|---|---|---|
| A | N<br>C | S<br>5 |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| B | N<br>C | S<br>6 |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| C | P<br>C | S<br>7 |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| D | P<br>C | S<br>8 |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| E | S<br>1 | S<br>9 |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| F | S<br>2 | ...    |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| G | S<br>3 |        |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| H | S<br>4 |        |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
|   |        |        |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
|   |        |        |  |  |  |  |  |  |  | 0 | 1 | 1 | 2 |

**NC** - negativní kontrola

**PC** - pozitivní kontrola

**S1, S2...** vzorek 1, vzorek 2,.....

- Rozplňte 50 µl ředícího roztoku připraveného k použití do testovacích jamek.
- Přidejte 50 µl **negativní a pozitivní kontroly** podle doporučeného schématu 1 duplicitně do příslušných jamek a zamíchejte.
- Přidejte 50 µl **vzorků** do zbývajících jamek a zamíchejte. Opatrně přikryjte testovací destičku.
- Inkubujte po dobu 2 hod při pokojové teplotě nebo přes noc a pak vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
- Vymyjte každou jamku 5krát s 300 µl připraveného **promývacího roztoku**. Odstraňte pufr po každém vymytí.

7. Přidejte 100  $\mu$ l značeného anti-gB-HRP konjugátu připraveného k použití do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 60 min při pokojové teplotě a ihned vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
9. Vymyjte každou jamku 5krát s 300  $\mu$ l připraveného promývacího roztoku. Odstraňte pufr po každém vymytí.
10. Přidejte 100  $\mu$ l **substrátového roztoku TMB** do každé jamky.
11. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Začněte měřit čas inkubace ihned po naplnění první jamky.
12. Zastavte reakci přidáním 100  $\mu$ l **Stop roztoku** do každé jamky. Stop roztok na jamku přidávejte ve stejném pořadí jako byl přidáván substrátový roztok TMB.
13. Změřte hodnotu optické density (OD) ve spektrofotometru při 450 nm ihned nebo do 20 min po zastavení reakce. Fakultativně je možno měřit i při vlnové délce 620-650 nm.

### 7.3. Postup při vyšetření vzorků mléka

Všechny reagenty před použitím přeneste do pokojové teploty 18 až 25°C a jemně je promíchejte vířením.

1. Rozdělení vzorků a kontrol na mikrodestičku - testovací protokol viz doporučené schéma 1
2. Rozplňte 100  $\mu$ l **negativní a pozitivní kontroly** podle doporučeného schématu duplicitně do příslušných jamek a zamíchejte
3. Přidejte 100  $\mu$ l **odtučněných vzorků mléka** do zbývajících jamek a zamíchejte. Opatrně přikryjte testovací destičku.
4. Inkubujte přes noc při pokojové teplotě a pak vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
5. Vymyjte každou jamku 5krát s 300  $\mu$ l připraveného **promývacího roztoku**. Odstraňte pufr po každém vymytí.
6. Přidejte 100  $\mu$ l značeného **anti-gB-HRP konjugátu** připraveného k použití do každé jamky
7. Inkubujte po dobu 60 min při pokojové teplotě a ihned poté vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
8. Vymyjte každou jamku 5krát s 300  $\mu$ l připraveného **promývacího roztoku**. Odstraňte pufr po každém vymytí.
9. Přidejte 100  $\mu$ l **substrátového roztoku TMB** do každé jamky.
10. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Začněte měřit čas inkubace ihned po naplnění první jamky.



11. Zastavte reakci přidáním 100 µl **Stop roztoku** do každé jamky. Stop roztok na jamku přidávejte ve stejném pořadí jako byl přidáván substrátový roztok TMB.

12. Změřte hodnotu optické density (OD) ve spektrofotometru při 450 nm ihned nebo do 20 min po zastavení reakce. Fakultativně je možno měřit i při vlnové délce 620-650 nm.

## 8. Validační kritéria

Výsledek může být považován za hodnověrný jestliže jsou získána následující kritéria :

|  |  |                      |
|--|--|----------------------|
| Průměr negativních má minimální OD 450 ≥ | <b>Průměr negativních kontrol má minimální hodnotu OD 450 ≥ 0,75</b><br>a<br>procentuální inhibice průměru pozitivních kontrol ≥ 80% | kontrol hodnotu 0,75 |
|  | a<br>procentuální inhibice průměru pozitivních kontrol ≥ 80%   |                      |

V případě, že test není validní, pak by měl být zopakován po důkladném prohlédnutí návodu k použití.

## 9. Kalkulace

1. Spočítejte průměrnou hodnotu (MV) naměřených OD negativních kontrol (NC) a pozitivních kontrol (PC).

2. Procentuální inhibici vypočítáte podle následující rovnice:

$$\text{Procento inhibice} = \frac{\text{Průměr } OD_{NC} - OD_{\text{vzorku}}}{\text{Průměr } OD_{NC}} \times 100$$

## 10. Interpretace

- pro vzorky s 2 hodinovou inkubací
- Vzorky s procentuální inhibicí nižší než 45% jsou negativní. Nejsou detekovány žádné specifické protilátky proti BHV1 .
- Vzorky s procentuální inhibicí vyšší nebo rovno 45% a nižší než 55% jsou považovány jako podezřelé. Doporučujeme re-testování podezřelých zvířat.

- Séra s procentuální inhibicí vyšší nebo rovno 55% jsou pozitivní. Byly detekovány specifické protilátky proti BHV1
- **pro vzorky s inkubací přes noc**
- Vzorky s procentuální inhibicí nižší než 55% jsou negativní. Nejsou detekovány žádné specifické protilátky proti BHV1 .
- Vzorky s procentuální inhibicí vyšší nebo rovno 55% a nižší než 65% jsou považovány jako podezřelé. Doporučujeme re-testování podezřelých zvířat.
- Séra s procentuální inhibicí vyšší nebo rovno 65% jsou pozitivní. Byly detekovány specifické protilátky proti BHV1

## 11. 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 a pod.) Po odsátí kapaliny odstraňte savý materiál a místo opláchněte proudem vody. Zabraňte kontaktu s kůží a očima - používejte osobní ochranné pracovní prostředky (gumové rukavice).

### 2) Vlastní likvidace diagnostické soupravy

A) Dezinfekce čerstvě připraveným 5% roztokem sodium hypochloridu po dobu 60 minut

nebo

B) Parní sterilizace při 120°C po dobu min 60 minut

nebo

C) Spálením ve spalovně biologických odpadů.

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

#### ***Způsob zneškodnění kontaminovaného obalu:***

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