

**Serologická diagnostika
specifických protilátek proti
patogenním Yersiniím u prasat
metodou ELISA
96 nebo 480 reakcí**

PIGTYPE® YOPSCREEN

Verze 1-061016

kat. číslo: 01- 201/1 (1 x 96 testů)

01- 201/5 (5 x 96 testů)

Návod k použití

Diagnostikum in vitro pro vzorky prasat

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	8
9. KALKULACE.....	9
10. INTERPRETACE	9
11. LIKVIDACE SOUPRAVY.....	10

1. Použití

PIGTYPE® YOPSCREEN je kompetitivní ELISA v mikrodestičkovém formátu. Je určena k detekci protilátek proti patogenním yersiniím ve vzorcích séra, plasmy a masové šťávy prasat. Tento test identifikuje protilátky proti patogenním kmenům Yersinií, které jsou předmětem zájmu i v humánní medicíně.

2. Všeobecné informace

PIGTYPE® YOPSCREEN umožňuje detekci protilátek proti virulentním kmenům Yersinií. V testu se používají vnější proteiny Yersinií (Yersinia Outer Proteins = Yops), které produkují pouze patogenní kmeny sahající napříč všemi sérotypy. Z tohoto důvodu je možno vyloučit jakoukoliv křížovou reakci se všemi nepatogenními druhy i s dalšími zástupci enterobacterií. PIGTYPE® YOPSCREEN je vhodná pro kvantifikaci protilátek proti yersiniím v séru nebo ve vzorcích masové šťávy. Proto je to efektivní metoda k monitoringu stavu infekce ve stádech po dosti dlouhou dobu a kontrola serologického statusu zakoupených zvířat.

3. Popis a princip testu

Mikrotitrační destička je potažena rekombinantními antigeny Yersinií. Během inkubace vzorku se na antigen pevně naváže specifická protilátka proti Yersiniím. Nenavázaný materiál je odstraněn následným promývacím krokem. Dále se přidá HRP značená specifická anti prasečí IgG protilátka, která se naváže na protilátky svázané s antigenem. Nenavázaný konjugát je odstraněn opětovným promýváním. Rozvoj barevné reakce je zahájen přidáním substrátového roztoku a je po 10 minutách zastaven. Optická densita (OD) se měří na spektrofotometru. Naměřené hodnoty korelují s koncentrací anti-Yersinia protilátek ve vzorku.

Informace pro objednání :

PIGTYPE® YOPSCREEN	1x 96 testů	kat.číslo 01-201/1
	5 x 96 testů	kat.číslo 01-201/5

4. Reagencie

	jedno destičkový kit	pěti destičkový kit
testovací destičky potažené rekombinantním neinfekčním antigenem Yersinia obsahující 12 mikrotitračních stripů po 8 jamkách	1	0
Testovací mikrotitrační destičky potažené rekombinantními neinfekčními antigeny Yersinia nedělené s 96 jamkami	0	5
Ředící roztok s proteiny a konzervovadlem, připravené k použití	60 ml	2 x 125 ml
Negativní kontrola, Yersinia negativní prasečí sérum s pufrům a stabilizátory bílkovin, připravené k použití	1,5 ml	1,5 ml
Pozitivní kontrola Yersinia pozitivní prasečí sérum v pufru se stabilizátory bílkovin, připravené k použití	1,5 ml	1,5 ml
Koncentrovaný vymývací roztok (10x) obsahující Tween a konzervans	125 ml	2 x 125 ml
Anti- IgG –HRP, kozí anti-prasečí IgG peroxidázový konjugát v pufru se stabilizátory bílkovin a konzervantem připravené k použití	12 ml	60 ml
Substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin) připravený k použití	12 ml	60 ml
Stop roztok - 0,5ml kyselina sírová, připravená k použití, Nebezpečné - žravina!	12 ml	60 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. spektrofotometr pro mikrodestičky
8. zkumavky nebo destičky pro ředění vzorků
9. 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). V případě, že se vytvořily krystaly solí v koncentrovaném vymývacím roztoku (10x), tyto rozpustíte mícháním a opatrným ohříváním. Lahvičky s koncentrovaným vymývacím roztokem (10x - lahvička 5) a Stop roztokem (lahvička 8) mohou být skladovány při pokojové teplotě (18°C až 25°C), aby se zabránilo tvorbě krystalů. 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 důsledné 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 a vzorků

Promývací roztok

Koncentrovaný vymývací roztok (10x), lahvička č. 5 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 roztok se dále nazývá **promývací roztok**. Řádně ho promíchejte.

Sérum a plasma:

Před použitím vzorků séra nebo plasmy do testu je zředte 1: 100 s ředícím roztokem např. 5 µl séra nebo plasmy zředte sv 495 µl ředícího roztoku a směs řádně zamýchejte. Dejte pozor, abyste měnili jednorázové špičky pipet po každém vzorku! **Kontroly jsou připravené k použití a proto je neředte!**

Masová šťáva:

Zamraďte přibližně 10 g krvavého a tuku zbaveného kusu svaloviny, např. ze svalového úponu bránice ve SALMOSTORE® masovém kontejnerku a pak jej nechejte rozmrazit. Pokud se bude jednat o monitorovací program, je vhodné stanovit striktně k odběru vzorku jedno přesné místo z těla zvířete. Vzorky zamraženého masa mohou být skladovány před testováním po dobu několika měsíců. Masová šťáva se uvolnění a nashromáždí po rozmrazení ve zkumavce pro masovou šťávu v kontejnerku,

Před použitím vzorků masové šťávy do testu je zředte v ředícím roztoku 1 : 10. Např. 25 µl masové šťávy rozředte ve 225 µl ředícího roztoku a řádně vše promíchejte.

7.2. Postup testování vzorků

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

- Inkubujte po dobu 60 min při pokojové teplotě a pak vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
- Vymyjte každou jamku 3krát s 300 μ l připraveného **promývacího roztoku**. Odstraňte pufr po každém vymytí.
- Přidejte do každé jamky 100 μ l **anti-IgG-HRP** konjugátu připraveného k použití do každé jamky. Opatrně přikryjte testovací destičku
- Inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě a ihned vyprázdněte jamky aspirací nebo vyklepáním.
- Vymyjte každou jamku 3krát s 300 μ l připraveného **promývacího roztoku**. Odstraňte pufr po každém vymytí.
- Přidejte 100 μ l **substrátového roztoku TMB** do každé jamky.
- Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Začněte měřit čas inkubace ihned po na plnění první jamky.
- Zastavte reakci přidáním 100 μ l **Stop roztoku** do každé jamky. Stop roztok na jamku přidávejte ve stejném pořadí jako byl přidáván substrátový roztok TMB.
- Kalibrujte spektrofotometr proti vzduchu jako blank. 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
pozitivních
má minimální
OD 450 \geq

Průměr negativních kontrol má minimální hodnotu OD 450 \geq **0,75**

a

procentuální inhibice průměru pozitivních kontrol \geq **80%**

kontrol
hodnotu
1,3

a

Průměr negativních kontrol má maximální hodnotu OD 450 \geq **0,15**

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:

$$\text{Procento aktivity (OD\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{Průměr OD}_{\text{NC}}}{\text{Průměr OD}_{\text{PC}} - \text{Průměr OD}_{\text{NC}}} \times 100$$

10. Interpretace

- Vzorky s procentuální aktivitou nižší než 10% jsou negativní. Nejsou detekovány žádné specifické protilátky proti patogenním Yersiniím.
- Vzorky s procentuální aktivitou vyšší nebo rovno 10% a nižší než 20% jsou považovány jako dubiózní. Doporučujeme re-testování podezřelých zvířat za několik týdnů.
- Vzorky s procentuální aktivitou vyšší nebo rovno 20% jsou pozitivní. Byly detekovány specifické protilátky proti patogenním Yersiniím.

11. Likvidace soupravy

11.1. Opatření při náhodném úniku

Soupravy jsou adjustovány a baleny způsobem, který neumožňuje náhodný únik kapalin ve větším rozsahu. V případě rozliti 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).

11.2. 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.