

**BioPro Rabies ELISA Ab kit**

**Souprava je vhodná k detekci protilátek ze séra**

**nebo plasmy metodou blocking ELISA**

480 reakcí

*Použití in vitro*

**Návod k použití**

katalogové číslo XXX

verze: vzteklina 1.0

**Výrobce a držitel rozhodnutí o schválení:**



 O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.

Bořetická 2668/1,

193 00 Praha 9 – Horní Počernice, Česká republika

info@oks.cz, www.biopro.cz

# Obsah

[Obsah 2](#_Toc23187178)

[1. Úvod 3](#_Toc23187179)

[2. Princip testu 3](#_Toc23187180)

[3. Obsah soupravy 3](#_Toc23187181)

[4. Materiál potřebný k provedení testu (není součástí této soupravy) 4](#_Toc23187182)

[5. Bezpečnostní opatření 5](#_Toc23187183)

[1) Příprava mikrodestiček 5](#_Toc23187184)

[2) Příprava promývacího roztoku 5](#_Toc23187185)

[3) Biotinylované anti-rabies protilátky 6](#_Toc23187186)

[7. Streptavidin peroxidázový konjugát 6](#_Toc23187187)

[8. Příprava vzorku 6](#_Toc23187188)

[9. Pracovní postup 7](#_Toc23187189)

[1) Inkubace vyšetřovaných a kontrolních sér 7](#_Toc23187190)

[2) Inkubace s biotinylovanou anti-rabies protilátkou 7](#_Toc23187191)

[3) Inkubace se streptavidin peroxidázovým konjugátem 7](#_Toc23187192)

[5) zastavení reakce 9](#_Toc23187193)

[6) vyhodnocení 9](#_Toc23187194)

[10. Validační kritéria 9](#_Toc23187195)

[12. Likvidace soupravy 11](#_Toc23187196)

[12.1. Opatření při náhodném úniku 11](#_Toc23187197)

[12.2. Vlastní likvidace diagnostické soupravy 11](#_Toc23187198)

[13. Dodatek – Kontakty 11](#_Toc23187199)

# 1. Úvod

Vzteklina je smrtelné onemocnění postihující člověka i zvířata.

Původcem je vysoce neurotropní virus vztekliny. Virus se většinou přenáší úzkým kontaktem s infikovanými slinami vzteklých zvířat prostřednictvím kousnutí nebo podrápání a pak se po nervových drahách dostává do CNS, kde způsobí onemocnění mozku, které nevyhnutelně končí smrtí.

Mezi nejčastěji infikovaná zvířata patří domácí i divoce žijící masožravci. V mnoha zemích se jako nástroj eradikace onemocnění používá orální vakcinace. Zhodnocení séroprevalence u vakcinované populace je jednou z metod pro vyhodnocení efektivity orální vakcinace.

Tento ELISA test je určen k detekci protilátek proti vzteklině domácích a volně žijících masožravců a validován byl u vzorků séra lišek a psů. Doporučujeme použití této metody pro diagnostiku protilátek proti vzteklině u lišek. Tato metoda je rychlá a jednoduchá.

# 2. Princip testu

Jamky mikrotitračních destiček jsou potaženy antigenem vztekliny. Naředěné vzorky se inkubují v jamkách.

Po vymytí se do jamek přidají biotinylatované protilátky anti-rabies. Pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje specifické anti-rabies protilátky, pak tyto blokují navázání biotinylovaných anti-rabies protilátek na potažený antigen vztekliny. Pokud vyšetřovaný vzorek neobsahuje specifické anti-rabies protilátky, pak biotinylovaná anti-rabies protilátka vytvoří komplex antigen-biotinylovaná protilátka. Po vymytí je do jamek přidán streptavidin-peroxidázový konjugát. Streptavidin peroxidáza se naváže na komplex antigen-biotinylovaná protilátka. Po dalším vymývacím kroku je do jamek přidán substrátový roztok (TMB) a komplex se zbarví na modro. Po zastavení reakce (H2SO4) se barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení se měří fotometricky při 450 nm a pokles intenzity v porovnání oproti negativní kontrole je úměrný množství blokujících protilátek ve vyšetřovaném vzorku.

# 3. Obsah soupravy

Souprava by měla být skladována v suchu a temnu při +2 °C až +8 °C

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Reagencie** |  **množství**  | **balení - detaily**  |
| Mikrodestičky potažené antigenem vztekliny  | 5 ks  | 16 jamkové stripy |
| Pozitivní kontrola  | 1 ml  | 1 lahvička s červeným víčkem  |
| Negativní kontrola  | 1 ml  | 1 lahvička s modrým víčkem  |
| Rabies kontrolní sérum 1 | 1 ml  | 1 lahvička  |
| Rabies kontrolní sérum 2 | 1 ml  | 1 lahvička  |
| Rabies kontrolní sérum 3 | 1 ml  | 1 lahvička  |
| Ředidlo vzorku (připravené k použití)  | 30 ml  | 1 lahvička  |
| Rozpouštědlo biotinylované protilátky (připravené k použití)  | 60 ml  | 1 lahvička  |
| Biotinylovaná anti-rabies protilátka (100x koncentrovaná)  | 1 ml  | 1 lahvička se žlutým víčkem  |
| Ředidlo Streptavidin peroxidázového konjugátu (připravené k použití) | 60 ml  | 1 lahvička  |
| Streptavidin peroxidázový konjugát (koncentrovaný 100x)  | 1 ml  | 1 lahvička se zeleným víčkem  |
| Roztok substrátu (TMB) (připravený k použití) | 60 ml  | 1 lahvička  |
| Stop roztok (H2SO4 0,5 M) (připravený k použití)  | 30 ml  | 1 lahvička  |
| Vymývací roztok (10x koncentrovaný)  | 500 ml  | 1 lahvička  |
| Adhezivní folie  | 15 ks  |  |

# 4. Materiál potřebný k provedení testu (není součástí této soupravy)

1. Přesné jedno a vícekanálové mikropipety pro přenášení 10 µl - 1000 µl.

2. Špičky pro mikropipety na jednorázové použití 10 µl - 1000 µl.

3. Manuální nebo automatický promývací systém mikrodestiček.

4. Odečítačka mikrodestiček s filtrem 450 nm.

5. Vortex, orbitální míchačka.

6. Termostat (37 °C).

7. Odměrné válce (50 ml až 1000 ml).

8. Centrifugační zkumavky.

9. Destilovaná nebo deionizovanou voda.

# 5. Bezpečnostní opatření

1. Všechny reagencie skladujte při +2 °C až +8 °C

2. Všechny reagencie soupravy kromě biotinylované protilátky a streptavidin-peroxidázového konjugátu musí být před použitím přeneseny do pokojové teploty (+18 °C až +25 °C) a ponechány na tuto teplotu vytemperovat.

3. Všechen materiál, který se dostane do přímého kontaktu se vzorkem, a reagencie považujte za potenciálně infekční.

4. Zabraňte kontaktu roztoku TMB substrátu s kůží, sliznicemi a očima.

5. Při manipulaci se vzorky a reagencii používejte jednorázové rukavice.

6. Nepipetujte ústy.

7. Pro každý vyšetřovaný vzorek používejte nové jednorázové špičky.

8. Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby exspirace a nemíchejte mezi sebou reagencie různých šarží.

9. Stop roztok (0,5 M H2SO4) může způsobit vážné popáleniny (R35). V případě zasažení kůže nebo očí, okamžitě důkladně vypláchněte proudem čisté vody a vyhledejte lékaře.

10. Použitá destilovaná nebo deionizovaná voda pro přípravu promývacího roztoku by měla mít dobrou kvalitu.

11. Chraňte roztok substrátu (TMB) před přímým slunečním světlem a oxidačními činidly. Při práci s TMB substrátem používejte pouze čisté laboratorní sklo nebo plasty.

12. Před likvidací všeho použitého materiálu a jednorázového materiálnu po testování ho dekontaminujte ponořením do čerstvě připraveného 5% chloridu sodného minimálně po dobu 1 hod nebo ho autoklávujte při 121 °C po dobu minimálně 30 min.

13. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

***6. Příprava reagencií***

## 1) Příprava mikrodestiček

Mikrodestičky by měly být před použitím přeneseny do pokojové teploty (+18 °C až +25 °C) a ponechány k vytemperování na tuto teplotu. Otevřené nepoužité stripy mohou být skladovány ve tmě v uzavřených plastových sáčcích s desikantem při teplotách od +2 °C do +8 °C maximálně po dobu 1 měsíce.

## 2) Příprava promývacího roztoku

Koncentrovaný vymývací roztok (10x) přeneste před použitím do pokojové teploty a nechejte vytemperovat. Během skladování při +2 °C až +8 °C se mohou vytvořit krystaly, které se v pokojové teplotě (+18 °C až +25 °C) rozpustí. Pokud se nerozpustí, pak mohou být ponechány při pokojové teplotě delší dobu nebo je možno roztok zahřát na maximálně 37 °C za stálého jemného míchání roztoku dokud se všechny krystalky nerozpustí.

Promývací roztok připravíme smícháním 1 objemového dílu koncentrovaného vymývacího roztoku (10x) s 9 objemovými díly destilované nebo neionizované vody (např. 50 ml koncentrovaného vymývacího roztoku (10x) přidáme k 450 ml destilované nebo neionizované vody).

## 3) Biotinylované anti-rabies protilátky

Zřeďte koncentrované biotinylované anti-rabies protilátky 1/100 ředidlem biotinylovaných protilátek (množství potřebné pro jednu destičku je představované ze směsi 110 µl koncentrované biotinylované anti-rabies protilátky a 11 ml ředidla biotinylovaných protilátek).

**Připravené pracovní ředění protilátek musí být spotřebováno během 8 hodin!**

#  7. Streptavidin peroxidázový konjugát

Zřeďte koncentrovaný Streptavidin peroxidázový konjugát v poměru 1/100 v ředidle pro Streptavidin peroxidázový konjugát (např. množství potřebné pro 1 destičku získáme smícháním 110 µl koncentrovaného biotinylovaného streptavidin peroxidázového konjugátu a 11 ml ředidla pro streptavidin peroxidázového konjugátu).

**Připravené pracovní ředění Streptavidin peroxidázového konjugátu musí být spotřebováno během 8** **hodin!**

# 8. Příprava vzorku

Vyšetřované vzorky séra musí být zředěny v poměru 1/2 s ředidlem vzorku (např. 60 µl + 60 µl) v pomocné destičce nebo v mikrozkumavkách. Pozitivní kontrolní sérum, negativní kontrolní sérum a kontrolní séra musí být rovněž zředěna stejným způsobem jako vzorky séra.

Individuální plnění 96 jamek je někdy dlouhý proces. Aby se zabránilo rozdílné délce inkubace jednotlivých vzorků a kontrol, je možné zředit testovací a kontrolní vzorky předem na 96jamkovou destičku (s U tvarem dna) a až poté je ve stejný čas přenést do ELISA mikrodestiček za použití vícekanálových pipet sloupec za sloupcem. Nicméně je nezbytné a zásadní připravit ředění vzorků a kontrol naprosto stejným způsobem.

*Poznámka*:

1) Na použité pomocné mikrodestičce nesmí být navázány žádné stopy proteinu.

2) Je rovněž možné ředit vzorky séra přímo v destičce. V tom případě rozplňte 50 µl ředidla vzorku do každé jamky a pak rozplňte 50 µl pozitivního kontrolního séra, negativního kontrolního séra a kontrolních sér do příslušných jamek. Pak rozplňte 50 µl vzorků séra do zbývajících jamek.

# 9. Pracovní postup

## 1) Inkubace vyšetřovaných a kontrolních sér

Poznámka: Před provedením testu přeneste všechny reagencie do pokojové teploty (+18 °C až +25 °C) a nechejte je na tuto teplotu vytemperovat.

 Všechny reagencie pak homogenizujte převrácením nebo na vortexu.

1.1 Vložte 100 µl zředěného pozitivního kontrolního séra do jamek A1 a B1

1.2 Vložte 100 µl zředěného negativního kontrolního séra do jamek A2 a B2

1.3 Vložte 100 µl zředěného kontrolního séra 1 do jamky C1

1.4 Vložte 100 µl zředěného kontrolního séra 2 do jamky D1

1.5 Vložte 100 µl zředěného kontrolního séra 3 do jamky E1

1.6 Vložte 100 µl zředěných vzorků sér do zbývajících jamek

1.7 Přikryjte destičku adhesivní folií a inkubujte přes noc (18 až 24 hod) při teplotě +2 °C až +8 °C za stálého jemného míchání na orbitální míchačce.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 |  2  | 3 |  4 | 5 | 6 | 7 |  8 | 9 | 10 | 11 |  12  |
| A  | PC  | NC  | 10  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B  | PC  | NC  | 11  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  C  | CS1  | 4  | 12  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D  | CS2  | 5  | 13  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E  | CS3  | 6  | 14  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F  | 1  | 7  | … |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G  | 2  | 8  | … |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  H  | 3 | 9 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## 2) Inkubace s biotinylovanou anti-rabies protilátkou

2.1 Sejměte folii z destičky, vyprázdněte obsah destičky a 6krát vymyjte promývacím roztokem. Po posledním vymývacím kroku destičku rázně vyklepejte na buničitou vatu.

2.2 Vložte do každé jamky 100 µl zředěných biotinylovaných anti-rabies protilátek

2.3 Přikryjte destičku adhesivní folií a inkubujte 30 min při +37 °C za stálého jemného míchání na orbitální míchačce.

## 3) Inkubace se streptavidin peroxidázovým konjugátem

3.1 Sejměte folii z destičky, vyprázdněte obsah destičky a 4krát vymyjte promývacím roztokem. Po posledním vymývacím kroku destičku rázně vyklepejte na buničitou vatu.

3.2 Vložte do každé jamky 100 µl zředěného streptavidin peroxidázového konjugátu

3.3 Přikryjte destičku adhesivní folií a inkubujte 30 min při +37 °C za stálého jemného míchání na orbitální míchačce.

4) ***Inkubace s TMB substrátem***

4.1 Sejměte folii z destičky, vyprázdněte obsah destičky a 4krát vymyjte promývacím roztokem. Po posledním vymývacím kroku destičku rázně vyklepejte na buničitou vatu.

4.2 Vložte do každé jamky 100 µl substrátového roztoku (TMB) (připraveného k použití).

4.3 Inkubujte 15-20 min při pokojové teplotě (+18 °C až +25 °C) za stálého jemného míchání na orbitální míchačce zakryté hliníkovou folií (ve tmě).

## 5) Zastavení reakce

5.1 Rozplňte 100 µl stop roztoku do každé jamky.

## 6) Vyhodnocení

6.1 Změřte optickou denzitu (O.D) při 450 nm.

# 10. Validační kritéria

- O.D. negativního kontrolního séra musí být vyšší 1.0

- Rozdíl mezi průměry OD negativního a pozitivního kontrolního séra (ODNC a ODPC) musí být rovno nebo vyšší než 0,8.

**Panel kontrolních sér**

- procentuální blokování kontrolního séra 1 musí být mezi 50 a 70 %

- procentuální blokování kontrolního séra 2 musí být mezi 30 a 50 %

- procentuální blokování kontrolního séra 3 musí být nižší než 30 %

**Pokud není některé z těchto validačních kritérií splněno, pak nejsou výsledky této testovací mikrodestičky validní a vzorky musí být znovu přetestovány.**

11. **Interpretace**

Pro každý vzorek vypočítáváme procento blokování (PB %):

ODNC - ODsample

PB % = ------------------------------------------- x 100

 ODNC - ODPC

**Interpretace:**

- Vzorky séra s PB menší než 40 % jsou považovány za negativní pro přítomnost protilátek vztekliny

- Vzorky sera s PB rovno nebo větší než 40 % jsou považovány jako pozitivní pro přítomnost protilátek vztekliny

- Vzorky sera s PB rovno nebo vyšší než 70 % jsou považovány jako vzorek sera s množstvím protilátek rovno nebo vyšším než 0,5 UI/ ml založeného na FAVN testu.

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Stav** |
| PB % <40 % | Negativní |
| PB % ≥40 % | Pozitivní |
| PB % ≥70 % | Množství protilátek je ≥  |

**Poznámka:**

Pro účely vyhodnocení účinnosti orální vakcinace doporučujeme použít první pozitivní *cut off*.

(PB je rovno nebo vyšší než 40 %). Pro interpretaci výsledků nedoporučujeme použití druhého *cut off* (PB je rovno nebo vyšší než 70 %), protože v praktických podmínkách jsou nejčastější vzorky lišek ve skutečnosti zředěny tělesnými tekutinami s neznámým ředicím faktorem, který téměř znemožní kvantifikovat skutečnou úroveň ochrany.

**Schéma testovací procedury:**

1 Ředění kontrolních sér a vzorků sér

1.1 Rozplnění 100 µl ředěného pozitivního kontrolního séra do jamek A1 a B1

1.2 Rozplnění 100 µl ředěného negativního kontrolního séra do jamek A2 a B2

1.3 Rozplnění 100 µl ředěného panelu kontrolních sér do jamek A3 – A5

1.4 Rozplnění 100 µl ředěného vzorku sér do zbývajících jamek

1.5 Inkubace přes noc při +2 °C až +8 °C za jemného míchání

2 Příprava biotinylované anti-rabies protilátky

2.1 Vymytí destiček 6krát

2.2 Rozplnění 100 µl ředěné biotinylované anti-rabies protilátky 1:100 do všech jamek

2.3 Inkubace 30 min při 37 °C za jemného míchání

3 Příprava streptavidin peroxidázového konjugátu

3.1 Vymytí destiček 4krát

3.2 Rozplnění 100 µl ředěného streptavidin peroxidázového konjugátu 1:100 do všech jamek

3.3 Inkubace 30 min při 37 °C za jemného míchání

4.1 Vymytí destiček 4krát

4.2 Rozplnění substrátového roztoku TMB do všech jamek

4.3 Inkubace 15–20 minut při pokojové teplotě (+18 °C až +25 °C) za jemného míchání

5.1 Zastavení reakce stop roztokem

6.1 Vyhodnocení absorbance (OD) při 450 nm

7.1 Validační kritéria

7.2 Interpretace výsledků

# 12. Likvidace soupravy

#

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

## 12.2. Vlastní likvidace diagnostické soupravy

a) Dezinfekce čerstvě připraveným 5 % roztokem chlornanu sodného 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.**

#  13. Dodatek – Kontakty

**Výrobce a držitel rozhodnutí o schválení:**

 

**O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.**

**Kanceláře**: Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika

tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz

**Servis**: Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika

tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, servis@oks.cz

**Infolinka**: +420 841 111 114

 www.biopro.cz