Zestaw BioPro
ELISA Ab do badań w kierunku wścieklizny

ELISA typu blokowania do detekcji przeciwciał wirusa wścieklizny w surowicy lub plaźmie

192 reakcje

Nr kat.: RAB01-02
Wersja: Rabies 1.1c

Instrukcja użytkowania

Producent

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.
Boreticka 2668/1, 193 00 Praha 9 – Horni Pocernice, Czech republic
tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz
Info: +420 841 111 114
www.biopro.cz

Dystrybutor w Polsce:

Nuscana biotechnika laboratoryjna
Ul. Wieruszowska 12-16, 60 – 166 Poznaň, Polska
Tel. +48 61 868 62 72, fax: +48 61 868 6273, www.nuscana. pl

WSTĘP

Wścieklizna jest śmiertelną chorobą wirusową, występującą u ludzi i zwierząt. Choroba ta jest spowodowana przez silnie-neurotropowego wirusa wścieklizny. Wirus jest najczęściej przekazywany przez bliski kontakt z zakażoną śliną wściekłych zwierząt, poprzez ugryzienia lub zadrapania, a następnie przez ścieżkę nerwową do CUN powodując encefalopatię i ostatecznie śmierć.

Udomowione i dzikie zwierzęta mięsożerne należą do najbardziej zainfekowanych. Do zwalczania wścieklizny u dzikich zwierząt mięsożernych stosuje się doustne szczepienia w wielu krajach. Do oceny skuteczności immunizacji doustnej w szczepionej populacji stosuje się m.in. metodę seroprewalencji.

Zestaw BioPro ELISA Ab do badań w kierunku wścieklizny został zaprojektowany do wykrywania przeciwciał wścieklizny u zwierząt mięsożernych udomowionych i dzikich, i został zwalidowany na próbkach surowicy lisów i psów. Zalecamy używać tego testu ELISA do wykrywania przeciwciał wściekliźny u lisów. Metoda ta jest szybka i prosta w porównaniu z metodami tzw. "złotego standardu": takimi jak FAVN lub RFFIT, jest wygodniejsza, ponieważ bardzo często jakość próbek surowicy lisiej może być obniżona przez zanieczyszczenia bakteryjne lub autolizę.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Studzienki mikropłytek powleczone są antygenem wścieklizny. Rozcieńczone próbki inkubuje się w studzienkach. Po przemyciu studzienek dodaje się biotynylowane przeciwciała przeciw wściekliźnie do studzienek. Jeśli badana próbka zawiera specyficzne przeciwciała przeciwko wściekliźnie, te blokują wiązanie biotynylowanych przeciwciał przeciwko wściekliźnie z antygenami wścieklizny w studzienkach. Jeśli badana próbka nie zawiera specyficznych przeciwciał przeciwko wściekliźnie, biotynylowane przeciwciała przeciwko wściekliźnie tworzą kompleks: antygenu i biotynylowanego przeciwciała. Po przemywaniu studzienek dodaje się koniugatu: peroksydazy-streptawidyny. Z peroksydazą-streptawidyny zwiąże się kompleks antygen-biotynylowane przeciwciało. Po kolejnym przemywaniu dodaje się substratu (TMB) do studzienek, tworząc niebieski związek, który staje się żółty po zatrzymaniu reakcji. Intensywność zabarwienia jest mierzona przy 450 nm a zmniejszenie intensywności koloru w porównaniu z kontrolą negatywną jest proporcjonalne do ilości przeciwciał blokujących w badanej próbce.

ODCZYNNIKI

Zestaw powinien być składowany w suchym i ciemnym miejscu w temperaturze 2-8°C.

▪ Opłaszczone mikropłytki	2 x 96 podziel. Mikropłytki
▪ Dodatnia surowica kontrolna wścieklizny	1 fiolka (0,6 ml), czerwona zatyczka
▪ Ujemna surowica kontrolna wścieklizny	1 fiolka (0,6 ml), niebieska zatyczka
▪ Surowica kontrolna wścieklizny 1	1 fiolka (0,3 ml), czarna zatyczka
▪ Surowica kontrolna wścieklizny 2	1 fiolka (0,3 ml), biała zatyczka
▪ Surowica kontrolna wścieklizny 3	1 fiolka (0,3 ml), przeźroczysta zatyczka
▪ Roztwór do rozcieńczeń próbek (gotowy do użycia)	1 butelka (15 ml)
▪ Roztwór do rozcieńczeń biotynylowanego przeciwciała (gotowy o użycia)	1 butelka (30 ml)
▪ Biotinylowane przeciwciało przeciw wściekliźnie (100x stężone)	1 fiolka (0,3 ml), żółta zatyczka
▪ Roztwór do rozcieńczeń peroksydazy-streptawidyny (gotowy do użycia)	1 butelka (30 ml)
▪ Koniugat peroksydazy-streptawidiny (100x stężony)	1 fiolka (0,3 ml), zielona zatyczka
▪ Substrat TMB (gotowy do użycia)	1 butelka (30 ml)
▪ Roztwór zatrzymujący reakcję; 0,5M H_2SO_4 (gotowy do użycia)	1 butelka (15 ml)
▪ Roztwór płuczący (10x stężony)	1 butelka (250 ml)
▪ Folie przylepne	6 folii

MATERIAŁY WYMAGANE ALE NIE WCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

- Mikropipety precyzyjne i wielokanałowe mikropipety dla objętości od 10 do 1000 μl
- Jednorazowe końcówki do pipet 10-1000 μ l
- Ręczny lub automatyczny system do mycia mikropłytki
- Czytnik mikropłytek, filtr 450 nm
- Vortex, wytrząsarka orbitalna
- Inkubator (37±2°C)
- Kolba pomiarowa (50-1000 ml)
- Probówki do wirówki
- Woda destylowana lub dejonizowana

ZASADY STOSOWANIA

- Przechowywać wszystkie odczynniki w temperaturze 2-8°C .
- Wszystkie odczynniki zestawu przed użyciem muszą być pozostawione do czasu osiągnięcia temperatury pokojowej (18-25°C), z wyjątkiem biotynylowanego przeciwciała i streptawidyny-peroksydazy.
- Kazdy materiał będący w kontakcie z próbkami oraz odczynnikami może stanowić zagrożenie zakaźne.
- Unikać kontaktu substratu TMB ze skórą, błonami śluzowymi i oczami.
- Nosić jednorazowe rękawice ochronne przy styczności z próbkami i odczynnikami.
- Nie pipetować ustami.
- Używać nowych końcówek do pipet do każdej badanej próbki.
- Nie używać odczynników po upływie daty ważności i nie mieszać odczynników z różnych partii.
- Substancja zatrzymująca reakcję zawiera roztwór kwasu (0,5 M H_2SO_4), który może spowodować poważne oparzenia. W przypadku kontaktu z oczami i skórą, natychmiast przemyć dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza.
- Destylowana lub dejonizowana woda dobrej jakości powina być stosowana do przygotowania roztworu do płukania.
- Należy unikać tworzenia się pęcherzyków piany poprzez ostrożnne pipetowanie i przemywanie.
- W trakcie procedury testowej mikropłytki nigdy nie powinny ulec wysuszeniu. Jeśli badanie zostało przerwane z jakichkolwiek powodów wtedy należy zostawić studzienki mikropłytki wypełnione roztworem do płukania.
- Chroń substrat TMB od bezpośredniego działania światła i utleniaczy. Używaj tylko czystego szkła laboratoryjnego lub tworzyw sztucznych do substratu TMB. Nie używaj substratu TMB jeśli widać kolor niebieski przed pipetowaniem do studzienek.
- Przed wyrzuceniem wszystkie użyte materiały i akcesoria jednorazowego użytku powinny zostać odkażone przez zanurzenie na co najmniej 1 godzinę w świeżo przygotowanym 5% podchlorynie sodu, lub w autoklawie w temperaturze 121±2°C przez minimum 30±1 minut.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

PRZYGOTOWANIE MIKROPŁYTEK

Mikropłytki należy pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej (18-25°C) przed użyciem. Otwarte niewykorzystane paski mogą być przechowywane w zamkniętej plastikowej torbie z pochłaniaczem wilgoci w temperaturze 2-8°C , w ciemności nie dłużej niż jeden miesiąc.

ROZTWÓR PŁUCZĄCY

Stężony roztwór płuczący (10x) należy doprowadzić do temperatury pokojowej przed użyciem. W temperaturze 2-8°C mogą tworzyć się kryształy, co zniknie w temperaturze pokojowej (18-25°C). Jeśli nie znikają, roztwór powinien być pozostawiony w temperaturze pokojowej przez dłuższy czas lub można ogrzać roztwór do 37±2°C i ostrożnie wytrząsać aż wszystkie kryształy rozpuszczą się.

Aby przygotować roztwór płuczący zmieszać 1 objętość stężonego roztworu do płukania (10x) z 9 objętości wody destylowanej (np. 50 ml stężonego roztworu do płukania (10x), dodać do 450 ml wody destylowanej).

BIOTYNYLOWANE PRZECIWCIAŁO PRZECIWKO WŚCIEKLIŹNIE

Rozcieńczyć stężony roztwór biotynylowanego przeciwciała przeciwko wściekliźnie 1/100 w roztworze do rozcieńczeń dla biotynylowanego przeciwciała. (np. ilość potrzebna dla jednej mikropłytki odpowiada mieszance 110 μl skoncentrowanego biotynylowanego przeciwciała przeciwko wściekliźnie i 11 ml roztworu do rozcieńczeń dla biotynylowanego przeciwciała).

Przed przystąpieniem do przygotowania roztworu roboczego, stężone biotynylowane przeciwciało przeciwko wściekliźnie musi być zworteksowane.

Przygotowany roztwór roboczy przeciwciała należy wykorzystać w ciągu 8 godzin!

KONIUGAT PEROKSYDAZA-STREPTAWIDYNY

Rozcieńczyć stężony koniugat peroksydazay-streptawidyny 1/100 w roztworze do rozcieńczeń koniugatu peroksydazy-streptawidiny (np. ilość potrzebna na jedną mikropłytkę odpowiada mieszance 110 μl zatężonej biotynylowanej peroksydazy-streptawidyny i 11 ml roztworu do rozcieńczeń dla koniugatu peroksydazy-streptawidiny).

Przed przystąpieniem do przygotowania roztworu roboczego, zagęszczona peroksydaza-streptawidyny musi być zworteksowana.

Przygotowany roztwór roboczy koniugatu peroksydazy-streptawidiny musi zostać wykorzystany w ciągu 8 godzin!

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Badane próbki surowicy należy rozcieńczyć 1/2 w roztworze do rozcieńczania próbek (np. 60 μ l + 60 μ l) na osobnej mikropłytce do rozcieńczeń lub w probówkach. Kontrola dodatnia surowicy, kontrola ujemna surowicy, surowice kontrolne muszą być rozcieńczane w taki sam sposób jak próbki surowicy.

Uwaga:

1. Jako mikropłytkę do rozcieńczeń można stosować dowolną mikropłytkę niewiążącą białek,
2. Jest również możliwe aby rozcieńczać kontrole i próbki surowicy bezpośrednio w mikropłytce. Odpipetować 50 μl roztworu do rozcieńczeń próbkek w studzienki, a następnie dodać 50 μ l kontroli dodatniej surowicy, kontrola ujemna surowicy i surowice kontrolne do celowych studzienek. Następnie odpipetować 50 μl próbek surowicy do pozostałych studzienek.

PROCEDURA BADANIA
1. INKUBACJA SUROWICE BADYCH ORAZ KONTROLNYCH

Uwaga: Wszystkie surowice kontrolne należy zworteksować przed pipetowaniem.

1.1. Wpipetować 100 μl rozcieńczonej kontroli dodatniej surowicy do studzienek A1 i B1.
1.2. Wpipetować 100 μl surowicy rozcieńczonej kontroli negatywnej do studzienek A2 i B2.
1.3. Wpipetować 100 μl rozcieńczonej surowicy kontrolnej 1 do studzienki C1.
1.4. Wpipetować 100 μl rozcieńczonej surowicy kontrolnej 2 do studzienki D1.
1.5. Wpipetować 100 μl rozcieńczonejsurowicy kontrolnej 3 do studzienki E1.
1.6. Wpipetować 100 μl rozcieńczonych próbek surowicy do pozostałych studzienek.
1.7. Przykryć płytkę samoprzylepną folią i inkubować przez noc (18 - 24 godzin) w temperaturze 2-8°C , delikatnie wytrząsając na wytrząsarce orbitalnej.

	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	…									
F	1	7										
G	2	8										
H	3	9										

2. INKUBACJA Z BIOTYNYLOWANYM PRZECIWCIAŁEM PRZECIWKO WŚCIEKLIŹNIE

2.1. Usunąć folię z płytki, opróżnić zawartości mikropłytki i przemyć 6 razy roztworem do płukania. Po ostatnim etapie płukania uderzać mikropłytką mocno o papierowy ręcznik.
2.2. Wpipetować rozcieńczone biotynylowane przeciwciało przeciwko wściekliźnie w ilości 100 μl na studzienkę.
2.3. Przykryć płytkę samoprzylepną folią i inkubować przez 30±1 minut w temperaturze 37±2°C delikatnie wstrząsając na wytrząsarce orbitalnej.

3. INKUBACJA Z KONIUGATEM PEROKSYDAZY-STREPTAWIDINY

3.1. Zdjąć folię z mikropłytki, opróżnić jej zawartość i przemyć 4 razy roztworem do płukania. Po ostatnim etapie płukania uderzać mikropłytką mocno o papierowy ręcznik.
3.2. Wpipetować rozcieńczony koniugat w ilości 100 μl w studzienki.

3.3. Przykryć płytkę samoprzylepną folią i inkubować przez 30±1 minut w temperaturze 37±2°C z delikatnie wstrząsając na wytrząsarce orbitalnej.

4. INKUBACJA Z SUBSTRATEM TMB

4.1. usunąć folię z mikropłytki, opróżnić jej zawartość i przemyć ją 4 razy roztworem do płukania. Po ostatnim etapie płukania uderzać mikropłytką mocno o papierowy ręcznik.
4.2. Wpipetować 100 µl gotowego do użycia substratu TMB w ilości 100 µl w studzienki.
4.3. Inkubować płytkę 15-30 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C) delikatnie wstrząsając na wytrząsarce orbitalnej, z dala od promieni słonecznych.

Uwaga: W przypadku gdy brak wytrząsarki obrotowej podczas inkubacji i wszystkie inkubacje wykonano bez wytrząsania, proponujemy przedłużyć inkubację mikropłytki z substratem TMB o co najmniej 20 minut.

5. ZATRZYMANIE REAKCJI

5.1. Wpipetować 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję w każdą studzienkę.

6. ODCZYT

6.1 Odczyt gęstości optycznej (OD) przy długości fali 450 nm.

7. KRYTERIA WALIDACYJNE

- OD ujemnej surowicy kontrolnej musi być wyższy niż 1,0.
- Różnica między średnimi OD negatywnej i pozytywnej surowicy kontrolnej musi być równa lub wyższa niż 0,8.

Jeśli kryteria walidacyjne nie są spełnione, wyniki badań tej konkretnej mikropłytki są nieważne, a badania należy powtórzyć.

7.1 PANEL SUROPWIC KONTROLNYCH:

Suropwice kontrolne należy stosować jako pomoc dla użytkownika testu, aby zapewnić, że test działa w optymalnych warunkach. Jeśli kryteria wymienione poniżej nie są osiągalne, prosimy o kontakt z producentem.

Procent blokowania dla surowicy kontrolnej 1 powinien wynosić od 45% do 70%.
Procent blokowania dla surowicy kontrolnej 2 powinien wynosić od 25% do 45%.
Procent blokowania dla surowicy kontrolnej 3 powinien wynosić mniej niż 30%.

7.2 INTERPRETACJA:

Oblicz procent blokowania (PB) dla każdej próbki:

$$PB\% = \frac{OD_{NC} - OD_{próbki}}{OD_{NC} - OD_{PC}} \times 100$$

- próbki surowicy z **PB niższym niż 40%** uważa się za negatywne dla przeciwciał wścieklizny.
- próbki surowicy z **PB równym lub wyższej niż 40**% uważa się za pozytywne dla przeciwciał wścieklizny.
- próbki surowicy z **PB równym lub wyższy niż 70%** uważa się za próbki surowicy z poziomem przeciwciał równym lub wyższym 0,5 IU/ml w oparciu o test FAVN.

Uwaga: W celu oceny skuteczności doustnego szczepienia zaleca się stosowanie pierwszej pozytywnej linii odcięcia (PB równa lub wyższa niż 40%). Nie zaleca się stosowania drugiej pozytywnej linii odcieńcia (PB równa lub wyższa niż 70%) do interpretacji wyników próbek surowicy lisiej, ponieważ większość próbek surowicy lisiej stanowią płyny ustrojowe z nieznanym współczynnikiem rozcieńczenia, co czyni prawie niemożliwym określenie dokładnego poziomu ochrony.

SCHEMAT PROCEDURY TESTU

1. Rozcieńczyć surowice kontrolne i próbki surowicy.
   1.1. Wpipetować po 100 µl rozcieńczonej surowicy kontroli dodatniej do studzienek A1 i B1.
   1.2. Wpipetować po 100 µl rozcieńczonej surowicy kontroli negatywnej do studzienek A2 i B2.
   1.3. Wpipetować po 100 µl rozcieńczonych surowic kontrolnych do studzienek A3-A5.1.4
   1.4. Wpipetować po 100 µl rozcieńczonych próbek surowic do pozostałych studzienek.
   1.5. Inkubować przez noc w temperaturze 2-8°C , lekko wstrząsając.
2. Przygotować biotynylowane przeciwciało przeciwko wściekliźnie.
   2.1. Przemyć mikropłytkę 6x.
   2.2. Wpipetować 100 µl rozcieńczonego 1/100 biotynylowanego przeciwciała przeciw wściekliźnie do wszystkich studzienek.
   2.3. Inkubować 30±1 minut w temperaturze 37°C , delikatnie wytrząsać.
3. Przygotować koniugat peroksydazę-streptawidyny.
   3.1. Przepłukać płytki 4x.
   3.2. Wpipetować 100 µl rozcieńczonego 1/100 koniugatu peroksydazy-streptawidyny z do wszystkich studzienek.
   3.3. Inkubować 30±1 minut w temperaturze 37°C , delikatnie wytrząsać.
4. TMB
   4.1. Umyć płytki 4x
   4.2. Wpipetować 100 µl substratu TMB do każdej studzienki.
   4.3. Inkubować 15-30 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C), delikatnie wytrząsać.
5. Zatrzymać reakcję dodając 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję.
6. Odczyt wartości absorbancji (OD) przy 450 nm.
7. Kryteria walidacyjne
   7.1. Uwzględnić kryteria walidacyjne.
   7.2. Interpretować wyniki.

Kontakt

Producent

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.
Boreticka 2668/1, 193 00 Praha 9 – Horni Pocernice, Czech republic
tel.: +420 281 091 460, fax: +420 281 866 264, info@oks.cz

Info: +420 841 111 114
www.biopro.cz

Dystrybutor w Polsce:

Nuscana biotechnika laboratoryjna
Ul. Wieruszowska 12-16, 60 – 166 Poznań, Polska
Tel. +48 61 868 62 72, fax: +48 61 868 6273, www.nuscana. pl

ZAŁĄCZNIK NR 1 do zestawu BioPro ELISA Ab do badań w kierunku wścieklizny – Instrukcja użytkowania, wersja 1.1

Data: 10.12.2013

Na podstawie informacji zwrotnej od użytkowników zdecydowaliśmy się dodać następujące informacje dotyczące instrukcji użytkowania zestawu BioPro ELISA Ab do badań w kierunku wścieklizny:

1. NIEWYSTARCZAJĄCA ILOŚĆ PRÓBKI

W przypadku niewystarczającej ilości surowicy (mniej niż 50µl) należy rozcieńczyć próbkę surowicy przy użyciu PBS do objętości 50µl (na przykład: do 30 µl surowicy dodać 20 µl PBS). Próbkę należy oznaczyć jako rozcieńczoną i następnie postępować zgodnie z instrukcją, krok 1.

2. POZYSKANIE PRÓBKI Z ZAKRZEPU

Alternatywnie próbka może być pozyskana z zakrzepu, postępując zgodnie z poniższą procedurą:

2.1. ZAKRZEP ŚWIEŻEJ KRWI

- Uciąć zakrzep świeżej krwi (pozyskany z serca lub głównych naczyń krwionośnych) i przenieść do probówki o pojemności 10-12 ml.
- Zamknąć probówkę i pozostawić w temperaturze pokojowej (18-25°C) lub w inkubatorze w temp. 37±2°C przez 2-3 godziny.
- Przenieść do lodówki (4-8°C) na 12 godzin ±30 minut (na noc).
- Odwirować część płynną od zakrzepu (5-10.000 rpm przez 15±10 minut). Otrzymany płyn traktować jak surowicę i postępować zgodnie z instrukcją, krok 1.

2.2. ZAKRZEP SUCHEJ KRWI

- Uciąć zakrzep suchej krwi, przenieść do probówki o pojemności 10-12 ml, dodać PBS z antybiotykami (PNC G 100000 U/l, STM 100mg/l, NEO 50 mg/l) maksymalnie w stosunku 1:1. Próbkę należy oznaczyć jako rozcieńczoną i następnie postępować zgodnie z punktem 2.1 załącznika.