Souprava PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip

ELISA pro *in vitro* detekci protilátek proti viru klasického moru prasat v séru a plazmě prasat

**Katalogové číslo** 7610600 **Publikace č.** MAN0013893 **Rev**. B.0

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image2.jpeg | **VAROVÁNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny k manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese **thermofisher.com/support.** |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image2.jpeg | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ**. Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese **termofisher.com**. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Úvod**

Virus klasického moru prasat (CSF, označovaný též jako prasečí cholera) je zástupcem rodu Pestivirus (společně s virem bovinní virové diarey a virem border nemoci ovcí) z čeledi Flaviviridae. CSF je nakažlivé virové onemocnění prasat, které je povinně hlásitelné (seznam B OIE), a jeho ohniska způsobují těžké hospodářské ztráty v zemích produkujících prasata. Rychlá detekce infikovaných zvířat je nezbytná pro zamezení dalšího šíření viru a pro kontrolu nemoci. CSFV je blízce příbuzný s pestiviry, které způsobují bovinní virovou diareu a tzv. border nemoc ovcí. Zejména na farmách, které se nacházejí v blízkosti chovů postižených viry BVDV nebo BD, může zkřížená reakce protilátek proti BVDV nebo BD způsobit falešně pozitivní výsledky v ELISA testech. Souprava Applied Biosystems PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip detekuje protilátky proti doméně A proteinu E2 viru CSFV, aby se předešlo falešně pozitivním reakcím. Je známo, že tato doména je specifičtější pro CSFV než doména B, C a D.

Souprava PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip detekuje protilátky proti vysoce, středně a nízko virulentním kmenům CSFV brzy po infekci. Detekce protilátek vyvolaných nízkovirulentními kmeny CSFV má zásadní význam pro sledování subklinických infekcí CSFV.

Souprava PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip spojuje pohodlný a jednoduchý testovací postup s vysokou citlivostí a specificitou. Souprava PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip je vhodná pro plošný screening.

**Princip testu**

Klíčovou reagencií používanou v soupravě PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip je monoklonální protilátka (mAb), která je namířena proti epitopu umístěnému na doméně A obalového proteinu E2 (GP-55) viru CSFV. Označení E1 pro obalový protein (GP-55) viru CSFV bylo předběžně změněno na E2 Mezinárodním výborem pro taxonomii virů (Austrálie, září 1995). Doména A byla vybrána z toho důvodu, že tato antigenní doména je specifičtější pro CSFV než domény B, C a D proteinu E2. Testovaný vzorek a ředidlo pro vzorek se nanesou do jamek na testovací destičce a inkubují se při teplotě 37 ± 1 °C. Destička se následně promyje a mAb-HRPO se nadávkuje do jamek a inkubuje při teplotě 37 ± 1 °C. Po promytí destičky se chromogenní substrát (TMB) nanese do všech jamek na testovací destičce. Po inkubaci při teplotě 22 ± 3 °C se zastaví vývoj barvy. Vývoj barvy měřený opticky při vlnové délce 450 nm prokazuje přítomnost protilátek proti viru klasického moru prasat.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Složky soupravy**  Souprava 5 destiček pro 450 vzorků. Skladujte soupravu při 5 ± 3 °C do data exspirace. Aktuální datum exspirace najdete na štítku soupravy. Skladovatelnost zředěných, otevřených nebo rekonstituovaných složek je v případě potřeby uvedena níže. | |  | **Další potřebný materiál**  Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**. | |
|  | **Použití** | **Popis** |
| **Složka** | **Popis** |  | Obecné | Laboratorní zařízení podle národních bezpečnostních předpisů. |
| 1. Test Plate (Testovací destička) | Pět testovacích destiček se dodává v sáčcích, které obsahují sáček s vysoušedlem. | Inkubace | Inkubátor mikrotitračních destiček (dosahující teploty alespoň 50 °C). |
| Analýza výsledků | Čtečka destiček. Čtečka musí být opatřena vhodnou sadou filtrů, umožňujících odečet destiček při 450 nm. |
| 1. Conjugate (30x) (Konjugát (30x)) | 30x koncentrovaný, zředěný před použitím. Jedna lahvička obsahuje 2,5 ml konjugátu. Zředěný konjugát není stabilní, připravte jej těsně před použitím. |
| Volitelné | Promývačka destiček. |
|  |  |  |
| 1. Conjugate Diluent (Ředidlo pro konjugát) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml ředidla pro konjugát. |  | **Postup testu** | |
| 1. Washing Fluid (200x) (Promývací koncentrát (200x)) | 200x koncentrovaný, nařeďte před použitím. Jedna lahvička obsahuje 60 ml promývacího koncentrátu. Doba použitelnosti promývacího roztoku: 1 týden při teplotě 22 ± 3 °C. |  | **Bezpečnostní opatření**   * Je nezbytné důsledně dodržovat národní bezpečnostní předpisy. * Souprava PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0 Strip se musí používat v laboratořích vhodných pro daný účel. * Vzorky je třeba považovat za potenciálně infekční a všechny položky, které přicházejí do styku se vzorky, jako potenciálně kontaminované.   **Poznámky**  K dosažení optimálních výsledků pomocí soupravy PrioCHECK Porcine CSFV Ab 2.0  Strip je třeba vzít v úvahu následující aspekty:   * **Protokol testovacího postupu musí být přísně dodržován**. * Všechny reagencie soupravy musí být před použitím ekvilibrovány na pokojovou teplotu (22 ± 3 °C). * Špičky pipet musí být vyměněny pro každý pipetovací krok. * Pro každou reagencii se musí použít samostatné zásobníky na roztok. * Jednotlivé složky soupravy se nesmí používat po vypršení doby použitelnosti nebo pokud jsou u nich pozorovány změny vzhledu. * Složky soupravy s různými čísly šarží soupravy se nesmí používat společně. * K provedení testu se musí použít demineralizovaná voda nebo voda stejné kvality. | |
| 1. Sample Diluent (Ředící roztok pro vzorek) | K přímému použití. Dvě lahvičky, každá lahvička obsahuje 11,0 ml ředícího roztoku na vzorky. |  |
| 1. Positive control (Pozitivní kontrola) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 2,2 ml pozitivní kontroly. |  |
| 1. Low positive control (Slabě pozitivní kontrola) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 2,2 ml slabě pozitivní kontroly. |  |
| 1. Negative Control (Negativní kontrola) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 2,2 ml negativní kontroly. |  |
| 1. Chromogen (TMB) Substrate (Chromogenní (TMB) substrát) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml chromogenního substrátu (TMB). |  |
| 1. Stop Solution (Zastavovací roztok) | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml zastavovacího roztoku. |  |
| Další obsah soupravy | * Příbalový leták * 10 destičkových uzávěrů |  |

**Řešení je třeba určit předem**

**Ředění konjugátů**

Zřeďte konjugát (30x) (složka 2) v poměru 1 : 30 v ředidle pro konjugát (složka 3); např. na jednu destičku připravte 12 ml (přidejte 0,4 ml konjugátu (30x) až 11,6 ml ředidla pro konjugát).

**Poznámka: Naředěný konjugát musí být připraven těsně před použitím.**

**Promývací roztok**

Promývací koncentrát (200x) (složka 4) musí být naředěn v demineralizované vodě v poměru 1 : 200 a postačuje na konečný objem 12 litrů promývacího roztoku.

Promývací roztok lze skladovat 1 týden při teplotě 22 ± 3 °C.

**Poznámka**: Nedostatečné promytí testovací destičky může vést k vysoké hodnotě pozadí. Použití automatizovaného zařízení je upřednostňováno jako výhodnější než promytí vícekanálovými pipetami nebo ponoření testovací destičky do promývacího roztoku, není však nutné. U žádné z metod není nutné namáčet testovací destičku mezi jednotlivým promývacími kroky. Pro dostatečné promytí destiček je nutný minimální objem 200 μl na jamku.

**Inkubace séra**

1. Naneste po 20 μl ředícího roztoku pro vzorek (složka 5) do všech jamek na testovací destičce (složka 1).
2. Do jamek A1 a B1 přidejte 80 μl negativní kontroly (složka 8).
3. Do jamek C1 a D1 přidejte 80 μl slabě pozitivní kontroly (složka 7).
4. Do jamek E1 a F1 přidejte 80 μl pozitivní kontroly (složka 6).
5. Do jedné (jednoduchý test) nebo do dvou (duplicitní test) sousedních jamek na testovací destičce naneste po 80 μl testovaného vzorku.
6. Uzavřete testovací destičku příslušným uzávěrem.
7. Destičku opatrně protřepejte.
8. Inkubujte destičku po dobu 60 ± 5 minut při teplotě 37 ± 1 °C.

**Inkubace s konjugátem**

1. Vyprázdněte destičku a promyjte ji 6krát pomocí 200 až 300 μl promývacího roztoku. Po posledním promývacím cyklu silně poklepejte na destičku.
2. Do všech jamek naneste po 100 μl zředěného konjugátu.
3. Uzavřete testovací destičku příslušným uzávěrem.
4. Inkubujte destičku po dobu 30 ± 1 minut při teplotě 37 ± 1 °C.

**Inkubace s chromogenním substrátem (TMB)**

1. Vyprázdněte destičku a promyjte ji 6krát pomocí 200 až 300 μl promývacího roztoku. Po posledním promývacím cyklu silně poklepejte na destičku.
2. Do všech jamek naneste po 100 μl chromogenního substrátu (TMB) (složka 9).
3. Inkubujte destičku po dobu 20 minut při teplotě 22 ± 3 °C.
4. Do všech jamek přidejte po 100 μl zastavovacího roztoku (složka 10).
5. Promíchejte obsah jamek destičky.

**Poznámka**: Zahajte přidávání zastavovacího roztoku 20 minut po naplnění první jamky chromogenním substrátem (TMB). Přidejte zastavovací roztok ve stejném pořadí a na stejná místa jako chromogenní substrát (TMB).

**Odečet testu a výpočet výsledků**

1. Změřte optickou hustotu (OD) jamek při 450 nm do 15 minut po zastavení vývoje barvy.
2. Vypočtěte průměrnou hodnotu **OD** **450** negativní kontroly (jamky A1 a B1). Jedná se o maximální hodnotu **OD** **450**.
3. Vypočítejte procento inhibice (PI) slabě pozitivního výsledku, pozitivní kontroly a testovaných vzorků podle vzorce níže.

**OD** **450** všech vzorků je vyjádřena jako procento inhibice (PI) vzhledem k **OD** **450** max.

PI = 100 - (OD450 testovaného vzorku/ OD450 max) x 100

**Výsledek interpretace**

**Validační kritéria**

1. Průměrná **OD** **450** negativní kontroly (jamky A1 a B1) musí být > 1,0.
2. Procentuální inhibice slabě pozitivní kontroly musí být > 50 %.
3. Procentuální inhibice pozitivní kontroly musí být > 80 %.

Nesplnění těchto kritérií je důvodem k vyřazení výsledků této konkrétní testovací destičky.

**Poznámka:**

* Je-li **OD** **450** testovaného vzorku vyšší než **OD** **450** max, může být procento inhibice interpretováno jako 0 %.
* Je-li průměrná hodnota **OD** **450** negativní kontroly menší než 1,00, je chromogenní substrát (TMB) pravděpodobně příliš studený. V takovém případě zahřejte roztok na 22 ± 3 °C nebo inkubujte po dobu až 30 minut.
* Je-li průměrná hodnota **OD** **450** negativní kontroly vyšší než 2,00, doporučuje se kratší inkubační doba s chromogenním substrátem (TMB).

**Interpretace procenta inhibice**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PI = <40% | Negativní | Protilátky specifické pro CSFV chybí v testovaném vzorku. |
| PI = ≥40% | Pozitivní | Protilátky specifické pro CSFV jsou přítomny v testovaném vzorku. |

**Reference**

1. Holm Jensen M (1981). Acta Vet Scand 22:85-98.
2. Wensvoort G, Bloemraad M, Terpstra C (1988). Vet Microb 17:129-140.
3. Wensvoort G (1989). J Gen Virol 70:2865-2876.
4. Wensvoort G, Boonstra J, Bodzinga BG (1990). J Gen Virol 71:531-540.
5. Colijn E, Bloemraad M, Wensvoort G (1997). Vet Microbiol 59:15-25.

**Zákaznická a technická podpora**

Technická podpora: navštivte **thermofisher.com/askaquestion**

Navštivte **thermofisher.com/support** pro nejnovější služby a podporu

:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Objednávková a webová podpora
* Uživatelské příručky, manuály a protokoly
* Osvědčení o analýze
* Bezpečnostní listy (BL; známé také jako MSDS)

**POZNÁMKA**: Pokud chcete získat bezpečnostní listy pro chemické látky jiných výrobců, kontaktujte výrobce.