|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **applied**biosystems | NÁVOD K POUŽITÍ |  |

PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit

ELISA pro *in vitro* detekci protilátek proti viru vezikulární choroby prasat v plazmě a séru prasat

**Katalogové číslo** 7610205 **Publikace č.** MAN0013854 **Rev. A**.0

|  |  |
| --- | --- |
|  | **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 stránkách [**thermofisher.com/support**.](http://thermofisher.com/support) |
|  |  |
|  | **VAROVÁNÍ!** **POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ.** Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese  [**thermofisher.com**.](http://thermofisher.com/) Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Úvod**

Vezikulární choroba prasat (SVD) je vysoce nakažlivé virové onemocnění prasat. Virus vezikulární choroby prasat (SVDV) je zástupcem rodu Enterovirus z čeledi Picornaviridae. I když je toto onemocnění často mírné povahy, je uvedeno na seznamu A Světové organizace pro zdraví zvířat (O.I.E.),protože je klinicky nerozeznatelné od slintavky a kulhavky. Z tohoto důvodu musí být epidemie vezikulární choroby prasat (SVD) považovány za onemocnění slintavka a kulhavka, dokud laboratorní diagnóza neprokáže jinak.

Souprava Applied Biosystems PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit splňuje požadavky pro použití v programech screeningu SVDV. Na základě terénní studie v Nizozemsku byla zjištěna specificita alespoň 99 % a citlivost 95 %. Souprava PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit je navíc pohodlný a jednoduchý test, který lze provést do 3 hodin [1]. Je zvláště vhodná k použití s automatizovanými systémy ELISA, včetně robotických zařízení.

Všechny pozitivně testované vzorky by měly být potvrzeny virus neutralizačním testem.

**Princip testu**

Souprava PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit je kompetitivní sendvičový test se dvěma protilátkami. Testovací destičky jsou potaženy monoklonální protilátkou mAb SVDV UK-72 a následně inkubovány s antigenem SVDV. Testovací destičky soupravy obsahují SVDV-antigen navázaný na imobilizovanou mAb. Test se provádí nanesením testovaného vzorku a následně se do jamek na testovací destičce přidá Conjugate (mAb SVDV UK-72/HRPO). Po inkubaci se destička promyje a do jamek se nanese Chromogen (TMB) Substrate. Po inkubaci při pokojové teplotě (22 ± 3 °C) se vývoj barvy zastaví. Vývoj barvy měřený opticky při vlnové délce 450 nm prokazuje přítomnost protilátek proti viru vezikulární choroby prasat.

Souprava PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit je jednoduchý diluční test. Vzorky séra a/nebo plazmy se testují v ředění 1 : 5.

**Složky soupravy**

Souprava 5 destiček pro 440 vzorků. Skladujte soupravu při 5 ± 3 °C do data exspirace. Datum exspirace je uvedeno na štítku soupravy. Skladovatelnost zředěných, otevřených nebo rekonstituovaných složek je v případě potřeby uvedena níže.

|  |  |
| --- | --- |
| **Složka** | **Popis** |
| 1: Test Plate | Souprava pěti testovacích destiček. |
| 2: Conjugate (30x) | 30x koncentrovaný, zředěný před použitím. Jedna lahvička obsahuje 1,5 ml konjugátu. Zředěný konjugát není stabilní, připravte jej těsně před použitím. |
| 3: Conjugate Additive (30x) | Lyofilizováno. 30x koncentrovaný, rekonstituujte před použitím. Jedna injekční lahvička obsahuje 1,2 ml lyofilizované reagencie Conjugate Additive. Doba použitelnosti rekonstituované reagencie Conjugate Additive: do data exspirace v případě uchovávání při -20 °C. |
| 4: Washing Fluid (200x) | 200x koncentrovaný, nařeďte před použitím. Jedna lahvička obsahuje 60 ml promývacího koncentrátu. Doba použitelnosti promývacího roztoku: 1 týden při teplotě 22 ± 3 °C. |
| 5: Dilution Buffer | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml Dilution Buffer. |
| 6: Demineralized Water | Dvě lahvičky, každá s obsahem 10 ml reagencie Demineralized Water. |
| 7: Blocking Reagent | Lyofilizováno. Pět lahviček, každá s obsahem 2,0 ml lyofilizované reagencie Blocking Reagent. Doba použitelnosti rekonstituované reagencie Blocking Reagent: do data exspirace v případě skladování při -20 °C. |
|  8: Reference Serum 1 | K přímému použití. Jedna injekční lahvička obsahuje 0,5 ml reagencie Reference Serum 1 (silná pozitivní kontrola). |
| 9: Reference Serum 2 | K přímému použití. Jedna injekční lahvička obsahuje 0,5 ml reagencie Reference Serum 2 (slabá pozitivní kontrola). |
| 10: Reference Serum 3 | K přímému použití. Jedna injekční lahvička obsahuje 0,5 ml reagencie Reference Serum 3 (negativní kontrola). |
| 11: Chromogen (TMB) Substrate | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml chromogenního substrátu (TMB). |
| 12: Stop Solution | K přímému použití. Jedna lahvička obsahuje 60 ml zastavovacího roztoku. |
| Další obsah soupravy | * Příbalový leták
* 5 destičkových uzávěrů
 |

**Další potřebný materiál**

Není-li uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce [**thermofisher.com.**](http://thermofisher.com/)

|  |  |
| --- | --- |
| **Použití** | **Popis** |
| Obecné | Laboratorní zařízení podle národních bezpečnostních předpisů. |
| Analýza výsledků | Čtečka destiček. Čtečka musí být opatřena vhodnou sadou filtrů, umožňujících odečet destiček při 450 nm. |
| Volitelné | Promývačka destiček. |

**Postup testu**

**Bezpečnostní opatření**

* Je nezbytné důsledně dodržovat národní bezpečnostní předpisy.
* Souprava PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit 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 SVDV Ab Kit je třeba vzít v potaz 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.

**Jen pro veterinární použití. Jen pro použití in vitro.**

**Řešení, která je třeba určit předem**

**Conjugate Additive**

Lyofilizovanou reagencii Conjugate Additive (složka 3) rekonstituujte pomocí

1,2 ml reagencie Demineralized Water (složka 6). Pro částečné použití zkušební soupravy by měla být rekonstituovaná konjugovaná aditiva rozdělena na alikvoty po 240 μl (maximálně pro 5 testů) a skladována při -20 °C do data exspirace.

**Blocking Reagent**

Lyofilizovanou reagencii Blocking Reagent (složka 7) rekonstituuje 2 ml Demineralized Water (složka 6). Lze skladovat při -20 °C až do data exspirace.

**Rekonstituce lyofilizovaných reagencií:**

1. Vytemperujte lahvičky při teplotě 22 ± 3 °C.
2. Držte lahvičku ve svislé poloze a jemným poklepáním proti pracovní desce zajistěte přesun obsahu na spodní stranu lahvičky.
3. Otevřete lahvičku.
4. Přidejte požadované množství reagencie Demineralized Water.
5. Nasaďte na lahvičku zátku a opatrně otáčejte lahvičkou tak, aby se veškerý zbývající suchý materiál rozpustil.
6. Lyofilizovaný materiál nechte stát po dobu 15 minut při teplotě 22 ± 3 °C.
7. Injekční lahvičku občas opatrně obraťte (je třeba zabránit tvorbě pěny).

**Ředění reagencie Conjugate**

Přidejte 200 μl rekonstituované reagencie Conjugate Additive, 1,8 ml rekonstituované reagencie Blocking Reagent a 200 μl reagencie Conjugate (30x) (složka 2) do 3,8 ml Dilution Buffer (složka 5) a opatrně promíchejte.

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

**Promývací roztok**

Reagencie Washing Fluid (složka 4) musí být zředěna 1 : 200 v Demineralized Water. Z jedné lahvičky reagencie Washing Fluid lze připravit celkem 12 litrů promývacího roztoku. Lze použít komerčně dostupné ELISA promývačky. Stabilita promývacího roztoku: 1 týden v případě skladování při teplotě 22 ± 3 °C.

**Inkubace vzorků, referenčních sér a konjugátu**

1. Do jamek G1 a H1 na testovací destičce (složka 1) naneste 50 μl Dilution Buffer (složka 5).
2. Do všech zbývajících jamek na testovací destičce naneste po 40 μl Dilution Buffer.
3. Do jamek A1 a B1 na testovací destičce (= OD450 blank) naneste 10 μl Reference Serum 1 (složka 8).
4. Do jamek C1 a D1 na testovací destičce naneste 10 μl Reference Serum 2 (složka 9).
5. Do jamek E1 a F1 na testovací destičce naneste 10 μl Reference Serum 3 (složka 10).
6. Do každé ze zbývajících jamek naneste po 10 μl testovaných vzorků.
7. Přidejte 50 μl zředěného konjugátu do všech jamek na testovací destičce.
8. Obsah destičky promíchejte ručně nebo pomocí destičkové třepačky.
9. Zakryjte testovací destičku příslušným krytem.
10. Inkubujte 120 ± 5 minut při teplotě 22 ± 3 °C.

**Inkubace s reagencií Chromogen (TMB) Substrate**

1. Vyprázdněte testovací destičku a promyjte ji 6krát pomocí 200 až 300 μl promývacího roztoku. Po posledním promytí silně poklepejte destičkou (namáčení jamek promývacím roztokem není nutné).
2. Do všech jamek naneste po 100 μl reagencie Chromogen (TMB) Substrate (složka 11).
3. Inkubujte 20 minut při teplotě 22 ± 3 °C.
4. Do každé jamky přidejte 100 μl reagencie Stop Solution (složka 12).
5. Před měřením promíchejte obsah jamek.

**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 OD450 jamek G1 a H1 (= OD450 max).
3. Vypočtěte průměrnou hodnotu OD450 jamek A1 a B1.
4. (Reference Serum 1 = OD450 blank).
5. Vypočítejte korigovanou hodnotu OD450 reagencií Reference Serum a všech vzorků odečtením hodnoty blanku OD450.
6. Vypočtěte procentuální inhibici (PI) reagencií Reference Serum 2, 3 a testovaných vzorků podle následujícího vzorce:

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

**Interpretace výsledků**

**Validační kritéria**

1. Hodnota OD450 max musí být > 1,000.
2. Průměrná hodnota OD450 reagencie Reference Serum 1 (= OD450 blank) musí být < 0,300.
3. Reagencie Reference Serum 2 by měla vykazovat procentuální inhibici > 50.
4. Reagencie Reference Serum 3 by měla vykazovat procentuální inhibici < 50.

Pokud nebude splněno některé z výše uvedených kritérií, musí být testované vzorky příslušné destičky testovány znovu.

**Poznámka:** Je-li průměrná hodnota OD450 menší než 1,000, je reagencie Chromogen (TMB) Substrate pravděpodobně příliš studená. V takovém případě zahřejte roztok na 22 ± 3 °C nebo inkubujte po dobu až 30 minut.

**Interpretace procenta inhibice**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PI = < 50 % | Negativní | Specifické protilátky proti SVDV nejsou v testovaném vzorku přítomny. |
| PI = ≥ 50 % | Pozitivní | Specifické protilátky proti SVDV jsou v testovaném vzorku přítomny. |

Doporučujeme znovu otestovat pozitivní séra v soupravě PrioCHECK Porcine SVDV Ab Kit. Pozitivní séra je třeba následně potvrdit virus neutralizačním testem.

**Dodatek - Reference**

Chénard, G., Bloemraad, M., Kramps, J.A., Terpstra, C., Dekker, A (1998). Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. Journal of Virological Methods, 75:105-112.

**Zákaznická a technická podpora**

Technická podpora: navštivte [**thermofisher.com/askaquestion**](http://www.thermofisher.com/askaquestion)

Navštivte  [**thermofisher.com/support** f](http://www.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.