**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava je určena k detekci specifických protilátek proti viru afrického moru prasat (ASFV) pomocí nepřímé konfirmační metody ELISA ve vzorcích prasečího séra, plazmy, masa, krve, masové šťávy a vzorků krevního filtračního papíru.

**Popis a princip**

Sudé mikrojamky jsou potaženy vrstvou p32, p62 a p72 rekombinantních proteinů ASFV. Liché jamky nejsou potažené žádným proteinem.

Vzorky, které se mají testovat, a kontroly, se přidají do sudých jamek. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky prosti ASFV, vytvoří komplex protilátka-antigen. V dalším kroku se do jamek mikrodestičky ELISA přidává konjugát označený křenovou peroxidázou (HRP), který se váže na komplex protilátka-antigen za vzniku konjugovaného komplexu protilátka-antigen-konjugát-HRP.

Po odstranění přebytečného konjugátu promytím se přidá roztok substrátu (TMB).

Po vymytí přebytečného konjugátu se přidá roztok substrátu (TMB). Rozdíl v intenzitě zabarvení mezi sudými a lichými jamkami závisí na množství specifických protilátek přítomných v testovaném vzorku.

- V přítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.

- V nepřítomnosti protilátek se neobjeví žádné zbarvení.

Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 540 nm

**Poznámka**: tato souprava neobsahuje infekční materiál.**Součásti soupravy**

**Obrázek 1**: Schéma destičky. Vzorky se dávkují dvojmo do sousedních sudých a lichých jamek. Bez Ag = jamka nepotažená antigenem, Ag = jamka potažená antigenem, NC = negativní kontrola, PC = pozitivní kontrola, S = vzorek.

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěnými rekombinantní proteiny p32, p62 a p72 viru ASFV |
| Koncentrovaný konjugát (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 14 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu |
| Stop roztok |

*\*dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy*

1. Roztok konjugátu, kontroly a roztok substrátu musí být skladovány při teplotě 5 °C (± 3 °C).

2. Ostatní činidla lze skladovat při teplotě +2 °C

 až +26 °C.

3. Podrobné informace o podmínkách skladování otevřených a/nebo neotevřených součástí soupravy naleznete na:

 https://www.id- vet.com/fr/support/faq.

4. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou řadu výrobků ID.Vet. Roztoky substrátu a ředící pufry se stejnými čísly šarží jsou zaměnitelné.

**Požadované materiály, které nejsou součástí soupravy**

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro dávkování 10 μl, 50 μl, 100 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
4. Manuální nebo automatický promývací systém.
5. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

**Bezpečnostní opatření**

1. Nepipetujte ústy
2. Roztoky obsahují složky, které mohou být škodlivé pro pokožku i oči a při kontaktu mohou způsobit podráždění. Pracujte tak, aby nedocházelo ke kontaktu s pokožkou a očima. Používejte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Stop roztok (0,5 M) může být při požití škodlivý.
3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.
4. Veškerý odpad by měl být před likvidací řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání nebo na adrese: info@innovativediagnostics.com.
5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

**Příprava vzorku**

Abyste předešli rozdílným inkubačním dobám u jednotlivých vzorků, připravte si 96 jamkovou destičku s testovanými a kontrolními vzorky. Poté přeneste testované vzorky a kontrolní roztoky do mikrotitrační destičky ELISA s využitím vícekanálové pipety.

**Příprava promývacího roztoku**

Pokud je to nutné, nechejte promývací koncentrovaný roztok (20x) po vyjmutí z chladničky pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a důkladně promíchejte, aby se zajistilo, že promývací koncentrát je zcela homogenní. Připravte si pracovní promývací roztok (1x) zředěním koncentrovaného promývacího roztoku (20x) v destilované nebo deionizované vodě v poměru 1:20.

**Postup testování**

Pokud je to nutné, nechejte všechna činidla po vyjmutí z chladničky ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Všechna činidla důkladně promíchejte pomalým převracením nebo kroužením.

Pozor: každý vzorek se dávkuje dvakrát, vždy po jednom podíle do sousedních jamek v mikrotitračních destičce, jak je znázorněno na obrázku č. 1.

**A: Pracovní postup pro vzorky séra nebo plazmy:**

1. Do jamek přidejte:
* 109 μl ředícího pufru 14 do každé jamky.
* 10 μl negativní kontroly do jamek A1, B1, A2 a B2.
* 10 μl pozitivní kontroly do jamek C1, D1, C2 a D2.
* 10 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

Každý vzorek musí být dávkován dvakrát do sousedních sudých a lichých jamek.

2. Inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

3. Pokračujte částí D.

**B: Pracovní postup pro vzorky masové šťávy:**

Vzorky masové šťávy by měly být co nejčistší. Při pipetování odstraňte ze vzorku jakékoliv zbytky a lipidy.

1. Do jamek přidejte:
* 190 μl ředícího pufru 14 a 10 μl roztoku negativní kontroly do jamek A1, A2, B1 a B2.
* 190 μl ředícího pufru 14 a 10 μl roztoku pozitivní kontroly do jamek C1, C2, D1 a D2.
* 50 μl ředícího pufru 14 a 50 μl testovaného vzorku, do zbývajících jamek.

Každý vzorek musí být dávkován dvakrát do sousedních sudých a lichých jamek.

2. Inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

3. Pokračujte částí D.

**C. Vzorky z filtračního papíru (Whatman č.1 nebo č.3)**

1. Vložte 2 disky filtračního papíru (průměr 6 mm) odebrané z 1 zvířete do zkumavky. V případě potřeby podrobnějších informací se obraťte na společnost ID.Vet.

2. Přidejte 200 μl ředícího pufru 14.

3. Pečlivě promíchejte kroužením. Ujistěte se, že byl každý disk zcela ponořen do ředícího pufru 14. Všechny zkumavky uzavřete.

4. Nechejte proběhnout eluci přes noc (16-20 hodin) při teplotě 21 °C (± 5 °C).

5. Směs promíchejte převracením nebo kroužením.

6. Po skončení procesu eluce směs znovu zamíchejte a přidejte:

* 190 μl ředícího pufru 14 a 10 μl roztoku negativní kontroly do jamek A1, A2, B1 a B2.
* 190 μl ředícího pufru 14 a 10 μl roztoku pozitivní kontroly do jamek C1, C2, D1 a D2.
* 50 μl testovaného eluátu z filtračního papíru do zbývajících jamek.

Každý vzorek musí být přenesen dvakrát do sousedních sudých a lichých jamek.

7. Inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

8. Přejděte k části D.

**D. Pokračující pracovní postup pro všechny typy vzorků:**

1. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte alespoň 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

2. Připravte si pracovní roztok konjugátu (1x) zředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 v ředícím roztoku 3.

3. Do každé jamky přidejte 100 μl naředěného roztoku konjugátu (1x).

4. Pečlivě utěsněte, inkubujte destičku 30 minut ± 3 minuty při teplotě 21 °C (± 2 °C).

5. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte alespoň 300 μl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

6. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

7. Inkubujte 15 minut ± 2 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C) v temnu

8. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku, aby se zastavila reakce.

9. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.**Kontrola:**

Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

www.innovative-diagnostics.com - E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

Vypočítejte čisté hodnoty OD (které se dále použijí pro kontrolu a vyhodnocení výsledků):



Test je platný, pokud:

čistá střední hodnota OD pozitivní kontroly (net ODPC) je větší než 0,350.



**ID Screen**

**Africký mor prasat**

**Nepřímý potvrzovací test**

Poměr čistých středních hodnot pozitivní kontroly (net ODPC) a negativní kontroly (net ODNC) je větší než 3.

****V tomto vzorci použijte absolutní hodnotu čisté ODNC.



**Vyhodnocení:**

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/P (S/P%):



**Nepřímý potvrzovací test ELISA pro detekci protilátek**

**proti africkému moru prasat ve vzorcích krevního séra, plazmy, masové šťávy a vzorcích krevního filtračního papíru.**

Pouze pro použití *in vitro*

Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.

**96 testů, 240 testů**

Rozmezí hodnot S/P pro všechny typy vzorků (sérum, plazma, krev, filtrační papír nebo masová šťáva) postupujte podle následující tabulky.

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/P ≤ 30 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **30% < S/P < 40 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/P ≥ 40 %** | **POZITIVNÍ** |

**Poznámka:**

Pokud je hodnota OD kontrolní jamky pro vzorek (jamka ODodd well) větší než průměrná hodnota čisté pozitivní kontroly (net ODPC), výsledek nelze vyhodnotit.