**Obecné informace**

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

**Popis a princip**

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy přečištěnými rekombinantními proteiny p32, p62 a p72 viru ASFV.

Vzorky, které se mají testovat, a kontroly se přidají do jamek testovací destičky. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky proti viru 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 vymytí přebytečného konjugátu se přidá roztok substrátu (TMB). Výsledné zbarvení jamek je přímo úměrné množství specifických protilátek přítomných ve 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 450 nm.

**Poznámka**: Tato souprava neobsahuje infekční materiál.

**Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **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.

1. Jednorázové špičky.
2. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
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.

Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Dbejte na to, aby byly jamky mezi promývacími kroky zcela prázdné. Pokud používáte automatickou promývací stanici, zkontrolujte si správné nastavení funkčních parametrů promývací stanice (režim, typ aspirace, výška aspirace). Další informace naleznete v příručce "IDvet Washing Guide", která je k dispozici na vyžádání.

**Postup testování**

Nechte všechna činidla dosáhnout pokojové teploty (21 °C ± 5 °C) před použitím. Homogenizujte všechna činidla inverzí nebo vířením.

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

1. Do jamek mikrotitrační destičky přidejte:

- 190 μl ředicího pufru 14 do každé jamky.

- 10 μl negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 10 μl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 10 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °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 ředicího 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 ředicího pufru 14 a 10 μl roztoku negativní kontroly do jamek A1 a B1.
* 190 μl ředicího pufru 14 a 10 μl roztoku pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.
* 50 μl testovaného eluátu z filtračního papíru do zbývajících jamek.

7. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

**Pracovní postup pro vzorky masové šťávy:**

Vzorky masové šťávy před testováním vyčistěte.

Při pipetování odstraňte ze vzorku zbytky a lipidy.

1. Do jamek mikrotitrační destičky přidejte:

* 190 μl ředicího pufru 14 a 10 μl roztoku negativní kontroly do jamek A1 a B1.
* 190 μl ředicího pufru 14 a 10 μl roztoku pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.
* 50 μl ředicího pufru 14 a 50 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

**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.

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

**Kontrola:**

Test je validní, pokud:

* průměrná hodnota OD pozitivní kontroly (ODPC) je vyšší než 0,350.



* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.



**Vyhodnocení:**

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



Rozmezí hodnot S/P pro všechny typy vzorků (sérum, plazma, filtrační papír nebo masová šťáva)

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

**Nepřímý skríningový 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.

**192 testů, 480 testů.**

**Poznámka**:

K dispozici je program pro analýzu dat IDSoft zdarma. Pro více informací se obraťte na email oddělení technické podpory: support.software@innovative-diagnostics.com

Tento program vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry nebo věk), dále nabízí grafické znázornění a sérologické profily testovaných zvířat.





**ID Screen**

**Africký mor prasat**

**Nepřímý skríningový test**