**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava detekuje protilátky Anti-gB při Aujeszkyho chorobě prasat a divokých prasat ve vzorcích séra a/nebo plazmy u infikovaných zvířat. Zachycení protilátek typu Anti-gB indikuje expozici viru způsobujícímu onemocnění (ADV) nebo vývoj protilátek po očkování.

**Popis a princip**

Jamky v mikrodestičce ELISA jsou potaženy přečištěnou antigenní suspenzí ADV.

Testované vzorky a kontrolní roztoky se přenesou do jamek mikrodestičky ELISA.

Pokud jsou v testovaném vzorku přítomny protilátky typu Anti-gB, vytvoří s přidanými antigeny 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 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**: Ředící pufr 4 mění barvu po přidání ke vzorku séra. **Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **Reagence\*** |
| Mikrodestičky potažené antigenní suspenzí ADV |
| Koncentrovaný roztok konjugátu (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 4 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrovaný roztok (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

*\*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, 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**

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.

**Protokol s krátkou inkubací:**

1. Do jamek mikrodestičky ELISA přidejte:

- 50 μl ředícího pufru 4 do všech jamek.

- 50 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 50 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 50 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 37 °C (± 2 °C).

**Protokol s inkubací přes noc:**

1. Do jamek mikrodestičky ELISA přidejte:

- 75 μl ředícího pufru 4 do všech jamek.

- 25 μl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.

- 25 μl negativní kontroly do jamek C1 a D1.

- 25 μl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte přes noc (16-20 hodin) při teplotě 21 °C (± 5 °C).

**Společný pokračující protokol:**

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

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

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

6. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 30 minut ± 2 minuty při teplotě 37 °C (± 2 °C).

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

8. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

9. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 15 minut ± 2 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C) v temnu.

10. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 8, aby se zastavila reakce.

11. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* průměrná hodnota negativní kontroly OD (ODNC) je větší než 0,7.



* poměr středních hodnot pozitivní kontroly (ODPC) a negativní kontroly (ODNC) je menší než 0,3.

**Vyhodnocení:**

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/N.



**Protokol s krátkou inkubací:**

**ID Screen**

**Aujeszky gB Competition**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/N ≤ 40 %** | **POZITIVNÍ** |
| **40% < S/N ≤ 50 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/N > 50 %** | **NEGATIVNÍ** |

**Protokol s inkubací přes noc:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/N ≤ 30 %** | **POZITIVNÍ** |
| **30% < S/N ≤ 40 %** | **HRANIČNÍ** |
| **S/N > 40 %** | **NEGATIVNÍ** |

**Kompetitivní souprava ELISA pro detekci protilátek Anti-gB při Aujeszkyho chorobě**

**u prasat nebo divokých prasat**

**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

**Vzorky séra nebo plazmy**

**Protokol s krátkou inkubací**

**nebo protokol s inkubací přes noc**

Pouze pro použití *in vitro*

Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.

**192 testů, 480 testů**

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

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