BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody Test Kit Manual

Catalog #: 10058-02 (192 godeuri); 10058-5 (480 godeuri)

Biostone Animal Health LLC. • 2021 V1

CUPRINS

INFORMAȚII GENERALE 3

Descrierea produsului 3
Prezentarea generală a procedurii 3
Conținutul kitului, depozitarea și perioada de valabilitate 3
Specificitate (reactivitate încrucișată) 4
Materialele necesare care nu sunt furnizate împreună cu kitul 4
Avertismente și precauții 4

PREPARAREA PROBELOR 5
Ser / Plasmă 5

PROTOCOLUL DE LUCRU 5
Prepararea reagenților 5
Protocolul ELISA 5
Rezultate 6
Interpretarea rezultatelor 6

GHID AL PROBLEMELOR 7
Fără culoare sau reacție a standardelor 7
Valori reduse ale densității optice (OD) în citirea Controlului Pozitiv 7
Valori crescute ale densității optice (OD) în citirea Controlului Negativ 7

INFORMAȚII GENERALE

Descrierea produsului

Kitul ***AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody Test Kit*** este conceput pentru detectarea anticorpilor specifici virusului pestei porcine africane. Pesta Porcină Africană (African Swine Fever – ASF), este o boală virală severă care afectează porcii domestici și sălbatici. Această boală animală transfrontalieră poate fi răspândită de porcii vii sau morți, domestici sau sălbatici, sau de produsele din carne de porc. De asemenea, transmiterea bolii poate fi realizată prin furaje sau prin materiale contaminate cum ar fi încălțăminte, haine, vehicule, cuțite, echipamente etc., din cauza rezistenței ridicate a virusului ASF la mediul înconjurător. Din punct de vedere istoric, au fost raportate focare în Africa și în anumite părți din Europa, America de Sud și Caraibe. Recent (din 2007), boala a fost raportată în mai multe țări din Africa, Asia și Europa, atât la porci domestici, cât și la porci sălbatici.

Virusul pestei porcine africane este un virus ADN răspândit din familia Asfarviridae, care infectează, de asemenea, și căpușele din genul Ornithodoros. Deși semnele de ASF și pestă porcină clasică (Classical Swine fever – CSF) pot fi similare, virusul ASF nu are legătură cu virusul CSF. Formele acute de ASF se caracterizează prin febră ridicată, depresie, anorexie și pierderea poftei de mâncare, hemoragii la nivelul pielii, avort la femelele însărcinate, cianoză, vărsături, diaree și moarte în 6-13 zile (sau până la 20 de zile). Formele subacute și cronice sunt cauzate de virusi cu o virulență moderată sau scăzută, care produc semne clinice mai puțin intense dar care se pot manifesta pe perioade mult mai lungi de timp. Simptomele bolii cronice includ pierderea în greutate, febra intermitentă, semne respiratorii, ulcere cronice ale pielii și artrită.

Suspiciunea virusului ASF poate fi susținută în urma semnelor clinice, dar confirmarea trebuie făcută cu teste de laborator, în special pentru a o diferenția de CSF. Kitul ***AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody Test Kit*** detectează anticorpi ASF în serul / plasma de porc. Kitul ***AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody Test Kit*** oferă o metodă de screening ELISA, simplă, rapidă, sensibilă și eficientă din punct de vedere al costurilor.

Prezentare generală a procedurii

Kitul se bazează pe metoda colorimetrică ELISA INDIRECTA. Antigenul proteic viral ASF a fost căptușit în godeurile plăcii. În timpul analizei, se adaugă proba de ser / plasmă diluată. Dacă anticorpii împotriva virusului ASF sunt prezenți în probă, aceștia se vor fixa de antigenul căptușit. Anticorpul secundar, marcat cu peroxidază, vizează anticorpii anti-ASF, iar intensitatea culorii rezultată după adăugarea substratului, este legată de cantitatea de anticorpi anti-ASF din probă.

Conținutul kitului, depozitarea și perioada de valabilitate

Cu ajutorul kitului ***AsurDxTM African Swine Fever (ASF) Antibody Test Kit*** se pot testa 192 probe/controale (Cat # 10058-02) sau 480 probe/controale (Cat # 10058-05). Reintroduceți toate microplăcile neutilizate în punga de folie și sigilați-le cu desicantul furnizat în ambalajul original. Perioada de valabilitate a kitului este de 18 luni dacă produsul este depozitat corespunzător.

Conținutul kitului	Cat # 10058-02	Cat # 10058-05	Depozitare
Placă căptușită cu antigen ASF	2 plăci x 96-godeuri	5 plăci x 96-godeuri	2°- 8°C
ASF Control Pozitiv (capac roșu)	1.8 ml	2 x 1.8 ml	2°- 8°C*
ASF Control Negativ (capac alb)	1.8 ml	2 x 1.8 ml	2°- 8°C*
25X HRP-Soluție conjugat anticorp	1.25 ml	2 x 1.25 ml	2°- 8°C*
ASF diluent probă (culoare roșie)	50 mL	120 mL	2°- 8°C
Diluent anticorp (culoare verde)	25 ml	60 ml	2°- 8°C
20X Soluție de spălare	56 ml	120 ml	2°- 8°C
Substrat TMB	24 ml	58 ml	2°- 8°C
Soluție de stopare	24 ml	58 ml	2°- 8°C

******IMPORTANT*** Dacă nu intenționați să utilizați kitul pentru mai mult timp de o lună calendaristică, se recomandă depozitarea controalelor pozitive și negative și a 25X HRP-Soluției conjugat anticorp la -20°C sau într-un congelator.***

Specificitate (reactivitate încrucișată)

Acest kit poate detecta anticorpii ASF la porci.

Materialele necesare care nu sunt furnizate împreună cu kitul

- Cititor de plăci (450 nm)
- Mixer vortex
- Pipete de 10, 20, 100 și 1000 µL, pipetă multi-canal de 50-300 µL (opțional).

Avertismente si precautii

Biostone vă recomandă cu insistență să citiți următoarele avertismente și precauții pentru a vă asigura că aveți cunoștință de tehnicile ELISA și alte detalii cărora ar trebui să le acordați atenție deosebită când efectuați testul. Mai multe informații găsiți în secțiunea ***Ghid al problemelor.*** Periodic, se fac optimizări și revizuiri ale kitului și manualului. Prin urmare, este important să urmați protocolul furnizat împreună cu kitul.

- Nu utilizați kitul după ce perioada de valabilitate a fost depașită;
- Utilizați cele doua controale, pozitiv și negativ, cu grijă;
- Nu utilizați reagenții de la alte kituri sau alte loturi. Reagenții și plăcile sunt specifici fiecărui lot sau kit;
- Asigurați-vă că anticorpul conjugat HRP și diluentul sunt amestecate în volume corecte;
- Mențineți o temperatură de laborator / cameră de 20 ° - 25 ° C (68 ° - 77 ° F). Evitați efectuarea testelor sub sau în apropierea orificiilor de ventilație, deoarece acest lucru poate provoca răcirea excesivă, încălzirea și / sau evaporarea. De asemenea, nu efectuați teste în lumina directă a soarelui, deoarece acest lucru poate provoca căldură excesivă și evaporare.
- Calitatea apei este foarte importantă; asigurați-vă că utilizați doar apă distilată sau deionizată;
- Când pipetați probele sau reactivii într-o placă goală, așezați vârfurile pipetei în colțul inferior al godeului, intrând în contact cu plasticul;
- Incubarea plăcilor de testare trebuie programată cât mai precis posibil;
- Adăugați mai întâi controalele și apoi probele;

- Plăcile trebuie păstrate întotdeauna în frigider (refrigerate) în saci sigilați cu desicant pentru a menține stabilitatea plăcii (plăcilor).
- Preveniți formarea condensului prin aducerea plăcilor la temperatura camerei în timpul ambalării.

PREPARAREA PROBELOR

Ser/Plasmă

Probele de ser sau plasmă se diluează la o diluție de 40 de ori folosind diluent ASF (de exemplu, 5 µL de ser / plasmă se adaugă la 195 µL de diluent ASF pentru a obține o diluție 1:40). Efectuați diluția la temperatura camerei și apoi utilizați imediat. Depozitați orice alte probe de ser sau plasmă la -20° C. Notă: controalele pozitive și negative sunt gata de utilizare.

PROTOCOLUL DE LUCRU

Prepararea reagentilor

IMPORTANT: Toți reactivii congelați trebuie aduși la temperatura camerei înainte de utilizare (1 - 2 ore la 20 - 25 ° C / 68 - 77 ° F); Asigurați-vă că ați citit secțiunea "Avertismente și precauții" la pagina 4. Soluțiile ar trebui să fie pregătite chiar înainte de efectuarea testului ELISA. *Toți reactivii trebuie amestecati prin inversare înainte de utilizare.* Nu întoarceți vârfurile de pipetă folosite sau reactivii utilizați în tuburile / sticluțele originale. Utilizați recipiente de unică folosință atunci când manipulați reactivii pentru a minimiza riscul de contaminare.

A. Prepararea soluției de spălare 1X

Se amestecă 1 volum de soluție de spălare 20X cu 19 volume de apă distilată.

B. Prepararea a 1X HRP-Soluție conjugat anticorp

Amestecați 1 volum de 25X HRP-Soluție conjugat anticorp cu 24 de volume de Diluent Anticorp. Preparati acest conjugat cu 5-10 minute inainte de utilizare

Protocolul ELISA

Cantitatea de reactivi necesară pentru o singură reacție este prezentată în tabelul de mai jos.

Component	Volum per godeu
Probă/Control Pozitiv/Control Negativ	100 uL
1X HRP-Soluție conjugat anticorp	100 uL
1X Soluție spălare	2 mL
Substrat TMB	100 uL
Soluție de stopare	100 uL

Notă: Toate probele si controalele trebuie să fie efectuate în duplicat

1. Aduceți placa căptușită cu antigen ASF și toți reactivii la temperatura camerei timp de cel puțin o oră.
2. Adăugați 100 µL ASF Control Negativ/ godeu în două godeuri ale plăcii.
3. Adăugați 100 µL ASF Control Pozitiv/ godeu în două godeuri ale plăcii.

4. Adăugați 100 µL de probă de ser / plasmă diluată anterior (1:40) în fiecare godeu.
5. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 30 de minute în incubator la temperatura de 37 ° C.
6. Goliți soluția din godeurile plăcii. Spălați placa prin adăugarea a 250 uL de soluție de spălare 1X în fiecare godeu al plăcii. Aruncați soluția de spălare și uscați placa pe prosoape de hârtie. Repetați de încă patru ori pentru un total de cinci spălări.
   Efectuați imediat următorul pas. Nu lăsați placa să se usuce.
7. Adăugați 100 µL din 1X HRP-Soluția conjugat anticorp în fiecare godeu al plăcii. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 30 de minute în incubator la temperatura de 37 ° C.
8. Goliți soluția din godeurile plăcii. Spălați placa prin adăugarea a 250 µL de soluție de spălare 1X în fiecare godeu al plăcii. Aruncați soluția de spălare și uscați placa pe prosoape de hârtie. Repetați de încă patru ori pentru un total de cinci spălări.
9. Se adaugă 100 µL de Substrat TMB în fiecare godeu al plăcii. Se acoperă placa cu folie și se incubează timp de 15 de minute la temperatura camerei.
10. Adăugați 100 µL soluție de stopare în fiecare godeu. Citiți placa cât mai curând posibil pe un cititor de plăci la o lungime de undă de 450 nm.

Rezultate

A. Se măsoară densitatea optică (OD) a godeurilor la 450 nm în decurs de 15 minute după ce dezvoltarea culorii a fost oprită.
B. Se calculează densitatea optică medie a controlului pozitiv (PC) și media densității optice a controlului negativ (NC).
C. Se calculează procentul de pozitivitate (PP) al tuturor probelor, exprimat ca procent de pozitivitate (PP) în raport cu densitatea optică medie a Controlului Pozitiv, după cum urmează:

$$\text{Procentul de pozitivitate (\%)} = \frac{\text{OD450 probă}}{\text{medie OD450 Control Pozitiv}} \times 100$$

Interpretarea rezultatelor

A. Procentul de pozitivitate al Controlului Negativ trebuie să fie <20%
B. Media Densității Optice a Controlul Pozitiv trebuie să fie ≥ 0.5

Notă: Neîndeplinirea oricăreia dintre aceste criterii este un motiv pentru a renunța la rezultatele rundei de testare.

C. Probele de ser /plasmă de porc

PP < 20% (negativ); Anticorpii ASF lipsesc în proba de testare.

PP ≥ 25% (pozitiv); Anticorpii ASF sunt prezenți în proba de testare.

20% ≥ PP > 25% probe suspecte, se recomandă retestarea la 1-2 săptămâni

Notă: Probele pozitive trebuie confirmate cu o a doua metodă.

GHID AL PROBLEMELOR

Nu se dezvoltă culoare sau reacție a standardelor

Cauze posibile	Recomandare
Reactivii au fost folosiți în ordine greșită sau s-a omis un pas.	Urmați protocolul cu atenție și repetați testul.
Anticorpul secundar a fost preparat incorect sau s-a deteriorat.	Toți anticorpii sunt specifici kitului și lotului. Asigurați-vă că anticorpul secundar și diluentul sunt amestecate în volume corecte.
Substratul TMB a fost deteriorat.	Utilizați un nou substrat TMB.

Valori reduse ale densității optice (OD) în citirea Controlului Pozitiv

Cauze posibile	Recomandare
Reagenți expirați sau aparținând unui lot diferit	Verificați data expirării și numărul lotului.
Soluția de spălare fost preparată incorect.	Utilizați soluția de spălare din kit și asigurați-vă că a fost preparată corect.
Au fost folosite prea multe cicluri de spălare	Aplicați numărul de cicluri de spălare prevăzute în kit
Timpul de incubare a fost prea scurt	Cronometrați fiecare placă separat pentru a vă asigura că respectați timpul de incubare, urmăriți protocolul de lucru.
Temperatura din laborator a fost prea scăzută	Mențineți temperatura din laborator între 20-25°C. Nu efectuați testul în apropierea instalației de aer condiționat sau lângă ferestre reci.
Reagenții și plăcile au fost prea reci	Asigurați-vă că reagenții au atins temperatura camerei. Scoateți reagenții din cutie și țineți-i la temperatura camerei cu cel puțin o ora înainte de lucru
S-a citit la o lungime de undă greșită sau cititorul este defect	Asigurați-vă că se citește la lungime de undă de 450 nm și citiți placa încă o dată. Verificați calibrarea aparatului și alinierea filtrelor.
Kitul a fost supus unui stres excesiv.	Verificați de cate ori a fost scos kitul din frigider. Verificați dacă kitul a stat la temperaturi extreme un timp prea îndelungat.
Placa/plăcile de lucru a/au fost compromisă/e.	Puneți placa la frigider doar în punga sigilată împreună cu desicantul pentru menținerea stabilității. Pentru a preveni formarea condensului, lăsați placa să ajungă la temperatura camerei în ambalajul său, sigilată.

Valori crescute ale densității optice (OD) în citirea Controlului Negativ

Cauze posibile	Recomandare
Soluția de spălare a fost diluată în apă de slabă calitate	Dacă calitatea apei este discutabilă, înlocuiți sursa de apă distilată
Soluția substrat s-a deteriorat	Substratul trebuie sa fie incolor înainte de aplicare
Spălarea a fost insuficientă sau spălătorul are performanțe reduse	Aplicați numărul de cicluri de spălare prevăzuți în instrucțiuni. Asigurați-vă că fiecare godeu este spălat cu cel puțin 250 µl soluție de spălare. Verificați funcționarea corectă a spălătorului, dacă curge sau dacă aspirarea este corecta.
Cititorul nu funcționează corespunzător sau nu face blanc. Aceasta se întâmplă atunci când culoarea este slabă dar apar valori OD mari	Verificați funcționarea cititorului cu ajutorul plăcii de calibrare, verificați alinierea filtrelor. Verificați modul de efectuare al blancului si face blanc din nou dacă este posibil.
Temperatura din laborator este prea mare	Mențineți temperatura din laborator între 20-25°C. Nu efectuați testul în apropierea surselor de căldură sau în lumină solară directă.
Reagenții au fost amestecați, contaminați sau preparați incorect	Asigurați-vă că se folosesc reagenți corespunzători și că soluțiile au fost preparate corect și nu există contaminare.

BIOSTONE™ ANIMAL HEALTH

Biostone Animal Health LLC
2860 Exchange Blvd. suite 160
Southlake, TX 76092 USA
Tel: (817)329-0500
Fax: (817) 329-0501

Creat și produs în USA
info@biostoneah.com
www.biostoneah.com

Anexa 1 - Etichete componente kit și traducere

Etichete componente kit - producător	Etichete componente kit - traducere
 AsurDx™ ASF Antigen-coated plate Lot: BY7958 Exp: Mar 2023	 AsurDx™ Placă căptușită cu Antigen ASF Lot: BY7958 Exp: Martie 2023
 AsurDx™ ASF Assay Diluent Lot: JS11477 Exp: Jun	 AsurDx™ ASF Diluent probă I Lot: JS11477 Exp: Iunie
 AsurDx™ 20x Wash Solution *Lot: W0720 Exp: Sept 2022*	 AsurDx™ 20x Soluție de spălare Lot: W0720 Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ TMB Substrate *Lot: T0815 Exp: Sept 2022*	 AsurDx™ Substrat TMB Lot: T0815 Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ Stop Solution *Lot: S0612 Exp: Sept 2022*	 AsurDx™ Soluție de stopare Lot: S0612 Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ ASF NC Negative Control Lot: BY13086 Exp: Sept 2022	 AsurDx™ ASF NC Control Negativ Lot: BY13086 Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ ASF PC Positive Control Lot: BY13086 Exp: Sept 2022	 AsurDx™ ASF PC Control Pozitiv Lot: BY13086 Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ ASF 25X HRP-Conj. Antibody Solution Lot: BY13087B Exp: Sept 2022	 AsurDx™ 25X HRP-Soluție conjugat anticorp Lot: BY13078B Exp: Septembrie 2022
 AsurDx™ ASF Antibody Diluent Lot: LK9801 Exp: Sept 2022	 AsurDx™ ASF Diluent Anticorp Lot: LK9801 Exp: Septembrie 2022

Eticheta Engleza

[redacted]

AsurDx™ African Swine Fever (ASF)
Antibody Test Kit
Cat. No.: 10058-05 (5 x 96 wells)

BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

STORAGE: 2°-8° C

Batch no.: LS41536
Exp.: 30-Nov-2027

Biostone Animal Health LLC

[redacted]

Eticheta Tradusa

[redacted]

AsurDx™ African Swine Fever (ASF)
Antibody Test Kit
Cat. No.: 10058-05 (5 x 96 godeuri)

BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

Depozitare: 2°-8°

LOT.: LS41536
Expirare.: 30-Nov-2027

Biostone Animal Health LLC

[redacted]