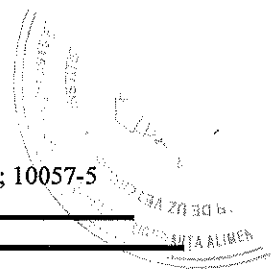


BIOSTONE TM
ANIMAL HEALTH

**AsurDxTM African Swine Fever (ASF) Antibody
bELISA Test Kit Manual**

Catalog #: 10057-02 (192 godeuri); 10057-5 (480 godeuri)

Biostone Animal Health LLC • 2019



CUPRINS

INFORMAȚII GENERALE.....	1
Descrierea produsului.....	1
Rezumatul procedurii.....	1
Conținutul kitului, depozitarea și perioada de valabilitate	1
Specificitate (reactivitate încrucișată).....	1
Materialele necesare care nu sunt furnizate împreună cu kitul	2
Avertismente și precauții	2
PREGĂTIREA PROBEI	2
Ser / Plasma.....	2
PROTOCOLUL DE TESTARE.....	3
Prepararea reactivului	3
Protocolul ELISA.....	3
Rezultate.....	4
Interpretarea rezultatelor.....	4
GHID AL PROBLEMELOR.....	5
Fără culoare sau reacție a standardelor.....	5
Valori reduse ale densității optice (OD) în citirea Controlului Pozitiv	5
Valori crescute ale densității optice (OD) în citirea Controlului Negativ....	5

Kitul de testare *African Swine Fever (ASF) Antibody bELISA* este destinat doar pentru cercetarea de laborator. Cu excepția cazului în care se indică altfel, acest produs NU va fi utilizat pentru diagnosticul clinic.

Biostone Animal Health nu oferă niciun tip de garanție, expresă sau implicită, cu excepția faptului că materialele din care sunt fabricate produsele sale sunt de calitate standard. Nu există nicio garanție a comercializării acestui produs sau a competenței produsului folosit în orice scop. Biostone Animal Health nu este răspunzătoare pentru daune, inclusiv daune speciale, consecințe sau cheltuieli care rezultă direct sau indirect din utilizarea acestui produs.



INFORMAȚII GENERALE

Descrierea Produsului

Kitul *AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody bELISA Test Kit* este conceput pentru detectarea anticorpilor specifici virusului gripei porcine africane. Gripa Porcina Africana (African Swine Fever – ASF), este o boală virală severă care afectează porcii domestici și sălbatici. Această boală animală transfrontalieră poate fi răspândită de porci vii sau morți, domestici sau sălbatici sau de produsele din carne de porc; de asemenea, transmiterea bolii poate avea loc 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 scroafele însărcinate, cianoză, vărsături, diaree și moarte în 6-13 zile (sau până la 20 de zile). Formele subacute și cronice sunt cauzate de viruși 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 bELISA Test Kit* detectează anticorpi ASF în serul / plasma de porc. Kitul *AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody bELISA Test Kit* oferă o metodă de screening simplă, rapidă, sensibilă și eficientă din punct de vedere al costurilor.

Prezentare generală a procedurii

Metoda se bazează pe ELISA colorimetrică blocking. Antigenul proteic viral ASF a fost captușit în godeurile plăcii. În timpul analizei, se adaugă proba de ser / plasmă. Dacă anticorpii împotriva virusului ASF sunt prezenți în probă, acesta se va fixa de antigenul captușit. După mai multe spălări pentru a elimina substanțele nefixate, se adaugă un conjugat monoclonal anti-ASF (mAb)-biotină și conjugatul Streptavidin-HRP. Complexul anti-ASF-mAb-biotină- Streptavidin-HRP se fixează la situsurile antigenice care nu au fost legate de anticorpii serici prezenți în probele pozitive. După incubare, excesul Complexului de anti-ASF-mAb-biotină-Streptavidin-HRP este eliminat printr-o a doua spălare și legarea lor este evidențiată cu substrat TMB.

În urma acestei incubării, porțiunea enzimatică a conjugatului, dacă este prezentă, reacționează cu substratul și se dezvoltă o culoare albastră. Reacția este oprită apoi (culoarea se schimbă de la albastru la galben) și se citesc



densitățile optice. Intensitatea culorii permite determinarea stării probei testate. O probă pozitivă va arăta o reacție slabă (galben pal), în timp ce un eșantion negativ va arăta o reacție puternică (galben închis). Toate nuanțele de galben între închis și pal reprezintă diferite grade de pozitivitate.

Conținutul kitului, depozitarea și perioada de valabilitate

Cu ajutorul kitului *AsurDx™ African Swine Fever (ASF) Antibody bELISA Test Kit* se pot testa 192 probe/controale (Cat # 10057-02) sau 450 probe/controale (Cat # 10057-05). Reintroduceți toate microplacile neutilizate în punga de folie și sigilați-le cu desiccantul furnizat în ambalajul original.

Conținutul kitului	Cat # 10057-02	Cat # 10057-05	Depozitare
Placă captușită cu antigen ASF	2 plăci x 96-godeuri	5 plăci x 96-godeuri	2°-8°C
ASF Control Pozitiv (cap roșu)	1.8 ml	2 x 1.8 ml	2°-8°C
ASF Control Negativ (cap alb)	1.8 ml	2 x 1.8 ml	2°-8°C
Conjugat monoclonal anti-ASF (mAb)-biotină (culoare verde)	12 ml	28 ml	2°-8°C
Conjugat Streptavidin-HRP	12 ml	28 ml	2°-8°C
ASF diluant probă (culoare roșie)	12 ml	30 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

**Dacă nu intenționați să utilizați kitul pentru mai mult timp de o lună calendaristică, se recomandă depozitarea controalelor pozitive și negative, a conjugatului monoclonal anti-ASF (mAb)-biotină și a conjugatului Streptavidin-HRP la -20 ° C sau într-un congelator.*

Specificitate (reactivitate încrucișată)

Acest kit poate detecta anticorpilor 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 și precauții

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 **Probleme ce ar putea apărea**. Periodic, se fac optimizări și revizuirii 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 depășită;
- Utilizați cu grijă cele două controale, pozitiv și negativ;
- Nu utilizați reagenții de la alte kituri sau alte loturi. Reagenții și plăcile sunt specifici fiecărui lot sau kit;
- 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 vârful pipetei în colțul inferior al godeului, făcând contactul 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/Plasma

Probele de ser sau plasmă sunt gata de utilizare pentru testarea ELISA. Depozitați toate probele de ser sau plasmă neutilizate la -20 ° C.

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 2. Soluțiile ar trebui să fie pregătite chiar înainte de efectuarea testului ELISA. Toți reactivii trebuie amestecați prin inversare înainte de utilizare. Nu puneți vârful de pipetă folosit sau reactivii utilizați înapoi în tuburile / sticlulele 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.

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 μ L
Probă	50 μ L
Diluant probă	50 μ L
Conjugat monoclonal anti-ASF (mAb)-biotină	50 μ L
Conjugat Streptavidin-HRP	50 μ L
1X Soluție spălare	2 mL
Substrat TMB	100 μ L
Soluție de stopare	100 μ L

Notă: Toate probele și controalele trebuie să fie efectuate în două exemplare

1. Aduceți placa captușită cu antigen ASF și toate componentele reactivului la temperatura camerei timp de cel puțin o oră.
2. Adăugați 100 μ L ASF Control Pozitiv / godeu în două godeuri al plăcii.
3. Adăugați 100 μ L ASF Control Negativ / godeu în două godeuri al plăcii.
4. Adăugați 50 μ L ASF diluant probă în fiecare godeu, apoi adăugați 50 μ L de ser/plasmă probă în fiecare godeu.
5. Amestecați soluția în godeuri agitând ușor placa, manual, timp de 1 minut.
6. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 30 de minute în incubator la 37 °C.
7. Se spală placa prin adăugarea a 250 μ L de soluție de spălare 1X în fiecare godeu al plăcii. Se aruncă soluția de spălare și se usucă 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.
8. Adăugați 50 μ L din conjugatul Streptavidin-HRP în fiecare godeu al plăcii și apoi adăugați 50 μ L din conjugatul monoclonal anti-ASF (mAb)-biotină în fiecare godeu.
9. Amestecați soluția în godeuri agitând ușor placa, manual, timp de 1 minut. Acoperiți placa cu folie și incubați timp de 30 de minute în incubator la 37 °C.
10. Se spală placa prin adăugarea a 250 μ L de soluție de spălare 1X în fiecare godeu al plăcii. Se aruncă soluția de spălare și se usucă placa pe prosoape de hârtie. Repetați de încă două ori pentru un total de trei spălări.
11. Se adaugă 100 μ L de soluție de anticorp conjugat HRP în fiecare godeu al plăcii. Se acopera placa cu



folie și se incubează timp de 15 de minute la temperatura camerei.

12. 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

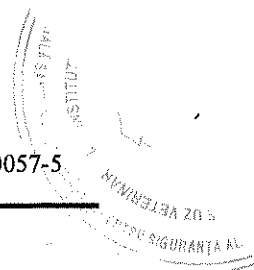
- A. Se măsoară densitatea optică (DO) a godeurilor la 450 nm în decurs de 15 minute după ce dezvoltarea culorii a fost oprită.
- B. Se calculează densitatea optică medie al controlului pozitiv (CP) și media densității optice a controlului negativ (CN).
- C. Se calculează Procentul de Inhibare (PI) tuturor probelor după cum urmează:

$$\text{Procentul de inhibare (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{DO}_{450} \text{ probă}}{\text{media DO}_{450} \text{ Control Negativ}} \right) \right] \times 100$$

Interpretarea rezultatelor

- A. Media DO a controlului negativ trebuie să fie $\geq 0,5$;
procentul de inhibare (%) al controlului pozitiv trebuie să fie $\geq 55\%$
Notă: Neîndeplinirea oricăruia dintre aceste criterii este un motiv pentru a renunța la rezultatele runde de testare.
- B. Probele de ser /plasma de porc
PI < 25% (negativ); Anticorpul ASF lipsesc în proba de testare.
PI $\geq 25\%$ (pozitiv); Anticorpul ASF sunt prezenți în proba de testare.

BIOSTONE™
ANIMAL HEALTH

**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 câte 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 compromise.	Puneți placa la frigider doar în punga sigilată împreună cu desiccantul 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 să 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 corectă.
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 și 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 lumina 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.



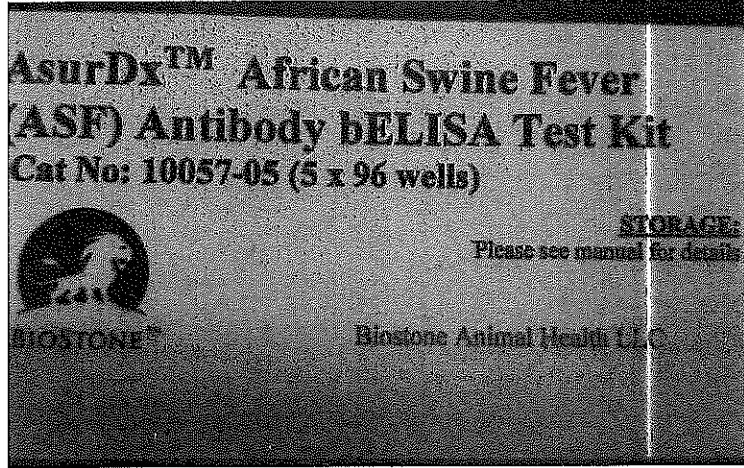
Biostone Animal Health LLC
2860 Exchange Blvd. suite 160
Southlake, TX 76092 USA
Tel: (817)329-0500
Fax: (817) 329-0501

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

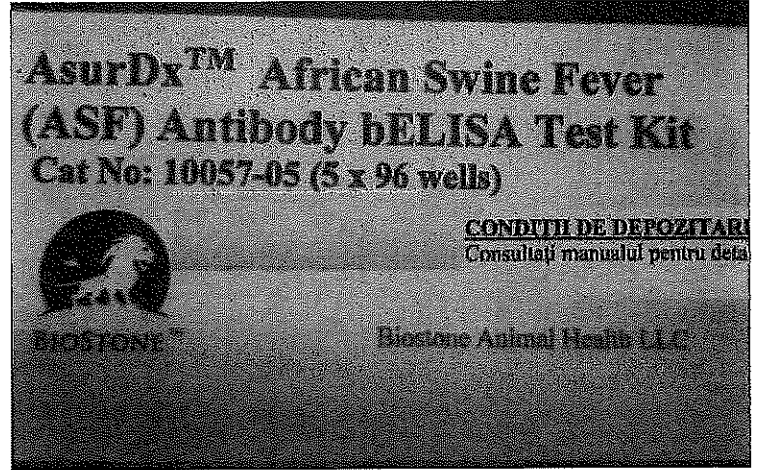
Handwritten signature

Appendix nr. 4.2 – Exterior Kit Label / Eticheta exterioara kit

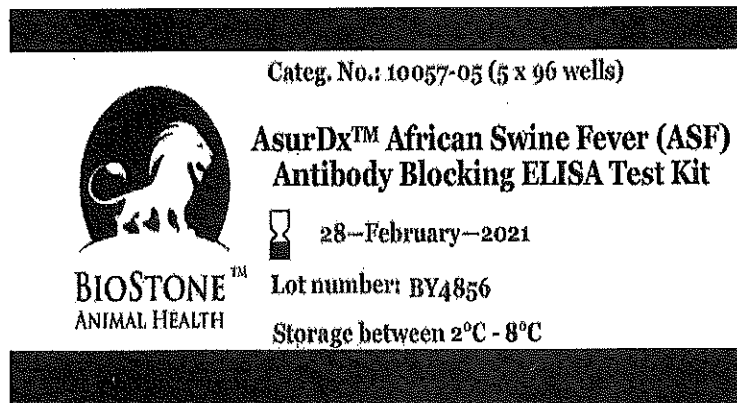
Exterior Kit Label (1)



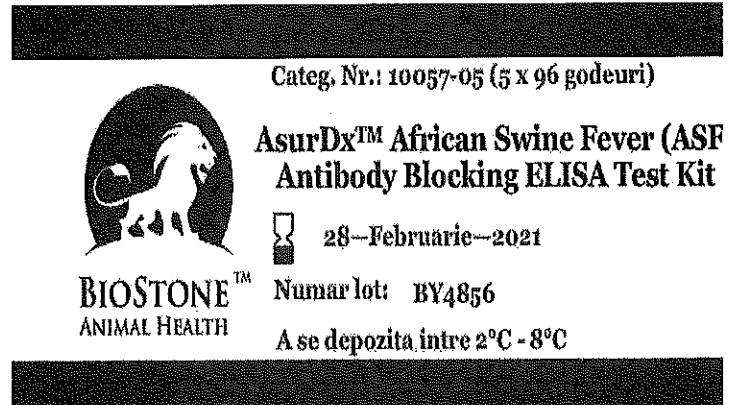
Eticheta exterioara kit (1)



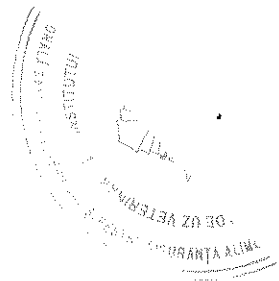
Exterior Kit Label (2)



Eticheta exterioara kit (2)



ky



[Handwritten signature]
L. F. F. F.

Appendix nr. 4.1 – Kit Components Labels / Etichete componentele kitului

Etichete producător



AsurDx™
ASF
Antigen-Coated Plate
Lot: BY4777 Exp: Aug 2021



AsurDx™
ASF
Positive Control
Lot: BY4769 Exp: Jul 2021



AsurDx™
ASF
Negative Control
Lot: BY4776 Exp: Jul 2021



AsurDx™
Anti-ASF mAb-
Biotin Conj.
Lot: BY4784 Exp: Feb 2021



AsurDx™
Streptavidin-
HRP Conjugate
Lot: BY4668 Exp: Jan 2022



AsurDx™
ASF
Assay Diluent
Lot: BY4711 Exp: Feb 2021



AsurDx™
20x
Wash Solution
Lot: 0715C Exp: Aug 2021



AsurDx™
TMB Substrate
Lot: 0715D Exp: Aug 2021



AsurDx™
Stop Solution
Lot: 0607C Exp: Aug 2021



AsurDx™
Placă captușită
cu antigen ASF
Lot: BY4777 Exp: Aug 2021



AsurDx™
ASF
Control Pozitiv
Lot: BY4769 Exp: Iul 2021



AsurDx™
ASF
Control Negativ
Lot: BY4770 Exp: Iul 2021



AsurDx™
Conjugat monoclonal anti-
ASF (mAb)-biotină
Lot: BY4784 Exp: Feb 2021



AsurDx™
Conjugat Streptavidin-
HRP
Lot: BY4668 Exp: Ian 2022



AsurDx™
ASF
Diluent Probă
Lot: BY4711 Exp: Feb 2021



AsurDx™
20x
Soluție de spălare
Lot: 0715C Exp: Aug 2021



AsurDx™
Substrat TMB
Lot: 0715D Exp: Aug 2021



AsurDx™
Soluție de stopare
Lot: 0607C Exp: Aug 2021

48


A. F. A.