

Тест-Система для выявления специфичных Антител к вирусу Репродуктивно - Респираторного Синдрома Свиней (PPCC)

Предназначение

VMTech PPCC ИФА АТ – иммуноферментный анализ для выявления антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома (PPCC) в сыворотке или плазме крови свиней.

Описание

Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) принадлежит к семейству *Arteriviridae*, роду *Arterivirus*. PPCC – вирусное контагиозное заболевание, характеризующееся абортами, рождением мертвых поросят, преждевременными опоросами или задержанием опороса и другими нарушениями в репродуктивной системе, а также поражением органов дыхания и образованием «синюшности» в области шеи, живота, вульвы и ушей. Болезнь была впервые описана в США в 1986 году и первоначально получила название «загадочная болезнь свиней». Позднее она была обнаружена в Канаде, в Голландии и Германии, а впоследствии и во многих других странах Европы, а также Азии и Африки. Клинические проявления, которые обычно можно наблюдать при вирусной PPCC-инфекции независимо от возраста, включают в себя анорексию, лихорадку, апатичность и общую подавленность. Вирус PPCC повышает восприимчивость организма животных к другим возбудителям, участвует в развитии смешанных инфекций как бактериальной, так и вирусной природы. Вторичные инфекции значительно увеличивают экономические потери от поражения вируса PPCC, их присутствие оказывает сильное влияние на смертность новорожденных поросят. Поросят, серо-положительных к вирусу PPCC, выявляют в 40-80% обследованных хозяйств по всему миру. Результат воздействия вируса PPCC или проведенной вакцинации возможно определить путем выявления специфических антител к данному возбудителю в сыворотке или плазме крови. Тест-набор обладает способностью обнаружить антитела, специфичные к различным штаммам вируса PPCC. Тест-набор предназначен только для лабораторной диагностики.

Принцип

Тест-система ВМТ PPCC предназначена для выявления специфичных Антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) в образцах сыворотки/плазмы крови свиней, методом иммуноферментного анализа (ИФА). На дно лунок представленного микропланшета химическим образом прикреплены молекулы рекомбинантного белка вируса PPCC - Антиген. Во время инкубации проб Антитела специфичные к вирусу PPCC (если они присутствуют в сыворотке/плазме крови) связываются с Антигеном и образуют устойчивый комплекс Антиген-Антитело на поверхности лунок микропланшета. После промывания и удаления не связавшегося материала специальным Буферным Раствором в лунки вносится Конъюгат – Раствор вторичных Антител (IgG), химически связанных с ферментом – пероксидазой хрена (HRPO). Конъюгат связывается со специфичными Антителами, находящимися в свою очередь в комплексе с Антигеном вируса PPCC на дне лунок микропланшета. Не связавшийся Конъюгат промывают специальным Буферным Раствором, а в лунки микропланшета вносится хромогенный субстрат (ТМВ). Последующее окрашивание прямо пропорционально количеству Антител, специфичных к вирусу PPCC, находящихся в пробе.

Комплектация

Комплект реагентов для исследования наличия антител, специфичных к вирусу РРСС представлен в двух форматах:

- ✓ Для исследования 182 образцов / 4 Контроля
- ✓ Для исследования 460 образцов / 4 Контроля

Все неиспользованные микролуночки и стрипы помещают в пакет из фольги и запечатывают их с влагопоглотителем, входящим в оригинальную упаковку. Срок годности составляет 12 месяцев при правильном хранении комплекта.

Содержимое	Формат – 1 (182 реак)	Формат – 2 (460 реак)	Хранение
Планшет с нанесенным рекомбинантным вирусным антигеном – РРСС	2 x 96-луночный планшет	5 x 96-луночный планшет	4 °С
Положительный Контроль	1,5 мл	1,5 мл	4 °С
Отрицательный Контроль	1,5 мл	1,5 мл	4 °С
Раствор Антител (IgG), конъюгированных с ферментом пероксидазой хрена (HRPO)	24 мл	58 мл	4 °С
Раствор для разведения образцов – разведение сывороток/плазмы крови свиней	50 мл	120 мл	4 °С
20x Промывочный раствор – для промывания лунок рабочего микропланшета	56 мл	120 мл	4 °С
Хромогенный субстрат (ТМВ)	24 мл	58 мл	4 °С
Стоп-раствор	24 мл	58 мл	4 °С

Материалы и Оборудование – дополнительные

- Прецизионные одно- и много- канальные дозаторы объемом от 5 до 1000 мкл (объемы реагентов, перечисленные в «Методике постановки» требуют точность дозаторов менее или равной 5%).
- Одноразовые наконечники к дозаторам.
- Мерный цилиндр на 500 – 1000 мл для приготовления Промывочного раствора.
- Микропланшетный фотометр для чтения 96-луночных планшетов с фильтром на 650 нм.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Пробирки/Титровальные плашки для разведения образцов. Устройство для промывки микротитровальных плашек.

Меры предосторожности

- Относитесь ко всему биологическому материалу, как потенциальному источнику инфекции.
- Не пипетируйте ртом !! Не принимайте пищу !! Не пейте !! Не курите !! во время постановки реакции. Избегайте контакта хромогенного субстрата с кожей и глазами !!
- Используйте защитные перчатки/ защитную одежду / средства защиты для глаз и лица.
- Не оставляйте ТМВ субстрат под воздействием яркого света или окисляющих веществ. При работе с ТМВ субстратом используйте только чистую стеклянную или пластиковую посуду.
- Храните все реагенты при температуре 2-8°C. Перед использованием ОБЯЗАТЕЛЬНО доведите реагенты до комнатной температуры 18-26°C, после использования поместите реагенты обратно в холодильник (температура 2-8°C).
- Проявляйте осторожность при постановки реакции для исключения загрязнения компонентов набора.
- Не используйте компоненты набора с истекшим сроком годности и не смешивайте компоненты из тест-систем разных серий.
- Оптимальные результаты достигаются при точном соблюдении данного протокола. Аккуратность при пипетировании и промывке на протяжении всего исследования необходимы для сохранения точности и достоверности.
- Используйте только дистиллированную или деионизированную воду для приготовления реагентов, используемых в тесте.
- Неиспользованные стрипы должны храниться в герметичном пластиковом пакете с влагопоглотителем при температуре 2-8°C.

Подготовка реагентов к работе

Промывочный Раствор

Для начала определите объем Промывочного раствора необходимого для проведения необходимых исследований. Разведите концентрат Промывочного раствора (20X) дистиллированной водой 1:19 (Например: 25 мл Промывочного концентрата (20X) + 475 мл дистиллированной воды). Промывочный раствор, аккуратно приготовленный, может использоваться и храниться 1-2 недели при температуре 2-8°C.

Разведение Проб сывороток/плазмы

Разведите пробы сывороток/плазмы крови в соотношении 1:150 Буфером для разведения образцов (Например: 10 мкл исследуемого образца + 140 мкл Буфера для разведения образцов в микропланшете для предварительного смешивания. Далее, возьмите рабочий микропланшет из набора и добавьте во все исследуемые лунки по 90 мкл Буфера для разведения образцов. Перенесите из предыдущего разведения по 10 мкл проб в рабочий микропланшет и перемешайте). **Примечание:** Контроли не разводить !!

Протокол

Все реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (18-26°C) и осторожно перемешаны переворачиванием и вращением. Используйте отдельный наконечник для каждого образца. Используйте новый наконечник для каждого образца и всегда записывайте расположение образцов на плашке. Тщательно перемешивайте образцы перед внесением их в лунки микропланшета.

1. Возьмите микропланшет с вирусным Антигеном и запишите схему будущего расположения образцов.
2. Внесите по 100 мкл **НЕРАЗВЕДЕННОГО** Отрицательного Контроля в две соответствующие лунки микропланшета. Внесите по 100 мкл **НЕРАЗБАВЛЕННОГО** Положительного Контроля в две соответствующие лунки микропланшета.
3. Внесите по 100 мкл предварительно **РАЗВЕДЕННЫХ** проб в соответствующие оставшиеся лунки микропланшета.
4. Инкубируйте **15** минут (± 5 мин.) при температуре 37 °С.
5. Удалите жидкость из всех лунок планшета. Промойте каждую лунку примерно 200 – 250 мкл Промывочного раствора не менее 3-5 раз. Удалите содержащуюся в лунках жидкость после каждой промывки. Избегайте высыхания планшета между промывками и внесением конъюгата. Удалите остатки Промывочного раствора.
6. Внесите в каждую лунку по 100 мкл готового Конъюгата.
7. Инкубируйте **15** минут (± 5 мин.) при температуре 37 °С.
8. Повторите шаг 5.
9. Внесите по 100 мкл ТМВ субстрата в каждую используемую лунку микропланшета.
10. Инкубируйте **8** минут (± 2 мин.) при температуре 18-26°C в темноте.
11. Внесите по 100 мкл Стоп-Раствора в каждую лунку для остановки реакции.
12. Проведите измерение на микропланшетном фотометре при длине волны 650 нм. Рассчитайте полученные результаты.

Валидация результатов

- ✓ Среднее значение ОП Отрицательного Контроля (**ОКО**) должно быть < **0.2**
- ✓ Среднее значение ОП Положительного Контроля (**ПКО**) должно быть > **0.5**

Примечание: Несоответствие любому из данных критериев является основанием для отклонения полученных результатов данного исследования. Реакция должна быть проведена повторно.

Интерпретация результатов

Наличие или отсутствие антител к вирусу РРСС определяется расчетом значения S/P для каждого образца:

- ✓ Образцы со значением **S/P** меньше **0,4** считаются – **ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ**.
- ✓ Образцы со значением **S/P** больше **0,4** считаются – **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ**.

Расчет полученных результатов

Таблица. 1.

Расчет средней плотности для Отрицательного Контроля – ОКО	Расчет средней плотности для Положительного Контроля – ПКО	Расчет S/P для исследуемого Образца
$\text{Сред ОКО} = \frac{(\text{ОКО.1} + \text{ОКО.2})}{2}$	$\text{Сред ПКО} = \frac{(\text{ПКО.1} + \text{ПКО.2})}{2}$	$\text{S/P} = \frac{(\text{Образец} + \text{сред ОКО})}{(\text{сред ПКО} - \text{сред ОКО})}$

Для расчета и получения результатов мы предоставляем таблицу в формате Excel, также наши наборы полностью совместимы с программой xChek для фотометров: Tecan Sunrise, Tecan Infinite F50, Immunochem-2100 и другими.