

SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking

ELISA-Kit zum Nachweis von anti-PCV2 (porcines Circovirus Typ 2)-Antikörpern in Serum (Einzelproben) vom Schwein

Quantitative Methode für Serumproben,
qualitative Methode für Serumproben

MONOPHASISCHER BLOCKING-ELISA
384 Einzel-Reaktionen

In-vitro-Diagnostikum für Schweine

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach §17c TierSG amtlich
zugelassen

Zul.-Nr. FLI-B 487

I. TESTPRINZIP

Der SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking ist ein monophasischer Blocking ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das porcine Circovirus Typ 2 in Serum von Schweinen.

In die mit PCV2-Antigen beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden die Kontrollen und die zu untersuchenden Proben gegeben. Wenn die Probe anti-PCV2-Antikörper enthält, wird das PCV2-Antigen der Beschichtung blockiert.

Nach dem Auswaschen wird anti-PCV2-Antikörper/Peroxidase-Konjugat zugegeben, das nur gebunden werden kann, wenn im ersten Reaktionsschritt das PCV2 Antigen frei geblieben ist. Nach nochmaligem Auswaschen wird Peroxidase-Substrat zugegeben, das sich unter Einwirkung des Peroxidase-Konjugates färbt. Durch Zugabe einer Stopplösung wird die Farbreaktion abgebrochen.

FÄRBUNG ZEIGT ALSO EINE NEGATIVE PROBE, REDUZIERTER FÄRBUNG EINE POSITIVE PROBE AN.

II. KIT ZUSAMMENSETZUNG UND KONSERVIERUNG

ZUSAMMENSETZUNG	REKONSTITUTION UND AUFBEWAHRUNG
4 Mikrotiterplatten, a 6 Streifen zu je 16 Vertiefungen enthalten, beschichtet mit Antigen des PCV2-Virus	Innerhalb von vier Wochen nach Öffnung des Beutels verwenden. Nach Gebrauch Beutel wieder verschließen!
Waschlösung (W) 200 ml 10x konzentriert	1:10 mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser verdünnen. <i>Innerhalb von 5 Tagen verwenden.</i>
Proben-Verdünnungslösung (SD) 100ml	gebrauchsfertig
Negativkontrolle (N), 5 ml	gebrauchsfertig
Positivkontrolle (P), 5 ml	gebrauchsfertig
Konjugat-Verdünnungslösung (CD), 50 ml	gebrauchsfertig
Konjugat: anti-PCV2 monoklonaler Antikörper mit Peroxidase, konzentriert (CJ) 100x, 700 µl	1:100 verdünnen in CD. Verdünnte Lösungen können 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
Gepuffertes Peroxidase Substrat (PS), 50 ml	gebrauchsfertig
Stopplösung (S), 25 ml	gebrauchsfertig
12 Folien	zum Abdecken der Platten

Reference: SCIRCO1.ND version n³ – 03/11/10

Die Teile seit der letzten Version geändert werden kursiv dargestellt. Version n² → n³: Änderung der Validierungsdaten des Tests (Teil VII(1) and VII(2)) und Änderung des Cut-Offs für die qualitative Methode (Teil VIII(2))

Hinweis: Den Kit und verdünnte Reagenzien bei +5 ± 3°C lagern und wie oben beschrieben verwenden.

III. ZUSÄTZLICH NOTWENDIGES MATERIAL

- Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser
- Präzisionspipetten (Bereich 0-1000 µl)
- Einmalpipettenspitzen
- Messzylinder (100 und 1000 ml)
- Automatische Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten .
- Photometer für Mikrotiterplatten (bichromatisch, Filter 450/630 nm oder monochromatisch, Filter 450 nm)
- Inkubator (+37 ± 3°C)

IV. VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Qualität der Ergebnisse hängt von der Beachtung der guten Laborpraxis und der Testdurchführungsvorschriften ab (s. VI).

1. Die Reagenzien aus Kits verschiedener Chargen nicht mischen!
2. Reagenzien nicht nach Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
3. Alle Reagenzien mindestens eine Stunde vor Gebrauch der Raumtemperatur aussetzen. **Hinweis:** Nur die in den folgenden Schritten verwendeten Reagenzien sind betroffen.
4. Alle Reagenzien und Proben wie infektiöses Material behandeln
5. Alle Reagenzien von Haut und Augen fern halten. Bei Kontakt sofort mit kaltem Wasser abwaschen.
6. Niemals mit dem Mund pipettieren.
7. Vermeiden Sie eine Kontamination zwischen den Proben während der Entnahme, der Lagerung oder des Transportes. Verwenden Sie neue Einweg-Pipettenspitzen für jede Probe.
8. Die Kontamination des Substrats mit metallischen Ionen, Oxidanzien oder Detergenzien ist zu vermeiden. Vergewissern Sie sich, dass alle Behältnisse sauber sind. Nicht dasselbe Behältnis oder dieselbe Pipettenspitze für das Konjugat und Substrat verwenden.
9. Reagenzien und kontaminiertes Material entsprechend der gesetzlichen Vorschriften zu entsorgen. Das Sicherheitsdatenblatt für dieses Produkt ist auf Anfrage erhältlich.

Gefahren (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze):

- R23/25: Giftig beim Einatmen und Verschlucken
R35: Verursacht schwere Verätzungen
R36/37/38: Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R41: Gefahr ernster Augenschäden
R42/43: Sensibilisierung bei Einatmen und Hautkontakt möglich
S7: Behälter dicht geschlossen halten
S24: Berührung mit der Haut vermeiden
S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt konsultieren
S30: Niemals Wasser hinzugeießen
S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

QUANTITATIVE METHODE FÜR SERUMPROBEN (1)

VI(1).PROBEN

Der Test wird durchgeführt mit Einzelproben aus Serum, die mit Probenverdünnungslösung (SD) 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt und dann in drei Kavitäten pipettiert werden. Die erhaltenen Werte werden in einem linearen Regressionsmodell verwendet; die Interpolation der drei Werte korreliert mit einem Titer (siehe Details im Abschnitt für die Interpretation) Hinweise zur Probenlagerung:

Probe	gekühlt (+ 5°C)	gefroren (- 20°C)	Raumtemperatur (+ 23°C)
Serum	max. 7 Tage	ja	nein

VI(1). ANWENDUNG DES TESTS

Bitte befolgen Sie die folgenden Hinweise genau. Verwenden Sie die Negativ- und Positivkontrolle jeweils dreifach für jeden Ansatz oder Platte.

A. VORBEREITUNG

Die Position und Verteilung der Kontrollen und Proben ist genau zu notieren.

Für die Titration der Seren sollten drei Vorverdünnungen in geeigneten Gefäßen hergestellt werden; von den Vorverdünnungen wird dann jeweils eine 1:10-Verdünnung in der Testplatte durchgeführt.

Für die Vorverdünnung und Verdünnung empfehlen wir folgendes Schema:

Vorverdünnung	Pipettierschema
1:10	10 µl Serum + 90 µl Probenverdünnungslösung (SD)
1:100	10 µl Serum, verdünnt 1:10 + 90 µl SD
1:1000	10 µl Serum, verdünnt 1:100 + 90 µl SD

B. DURCHFÜHRUNG

I - VERTEILUNG DER KONTROLLEN UND PROBEN

1. Verteilung der Kontrollen:

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

Nach Schütteln der Gefäße geben Sie 100 µl der Negativkontrolle (N) in die Kavitäten A1, A2 und A3. Geben Sie 100 µl der Positivkontrolle (P) in die Kavitäten B1, B2 und B3.

2. Verteilung der Proben:

Verdünnen Sie die Proben 1:10 in der Testplatte indem Sie 90 µl SD und 10 µl der Vorverdünnungen (1:10, 1:100; 1:1000) für jede zu testende Probe in die Kavitäten pipettieren!

	1	2	3	4	5	6
A	NC	NC	NC	S7 - 1:100	S7 - 1:1000	S7 - 1:10000
B	PC	PC	PC	S8 - 1:100	S8 - 1:1000	S8 - 1:10000
C	S1 - 1:100	S1 - 1:1000	S1 - 1:10000	S9 - 1:100	S9 - 1:1000	S9 - 1:10000
D	S2 - 1:100	S2 - 1:1000	S2 - 1:10000	S10 - 1:100	S10 - 1:1000	S10 - 1:10000
E	S3 - 1:100	S3 - 1:1000	S3 - 1:10000	S11 - 1:100	S11 - 1:1000	S11 - 1:10000
F	S4 - 1:100	S4 - 1:1000	S4 - 1:10000	S12 - 1:100	S12 - 1:1000	S12 - 1:10000
G	S5 - 1:100	S5 - 1:1000	S5 - 1:10000	S13 - 1:100	S13 - 1:1000	S13 - 1:10000
H	S6 - 1:100	S6 - 1:1000	S6 - 1:10000	S14 - 1:100	S14 - 1:1000	S14 - 1:10000

Die Teststreifen sollten so in dem Rahmen angeordnet sein, dass ein automatischer Washer, sowie ein ELISA-Reader benutzt werden kann. Verschließen der Kavitäten mit den beiliegenden Folienstreifen Testplatte vorsichtig schütteln!

3. Inkubation der Platte :

60 ± 5 min bei +37 ± 3°C inkubieren.

WASCHEN:

Waschlösung: Verdünnen Sie das 10fach-Konzentrat (W) 1:10 in destilliertem oder entmineralisiertem Wassers.

Nach Absaugen oder Verwerfen der Proben werden sämtliche Vertiefungen 4mal gewaschen.

Entfernen der Waschlösung.

II - ZUGABE DES KONJUGATS

1. Vorbereitung des Konjugats:

Peroxidase-Konjugat (CJ) mit Konjugat-Verdünnungslösung (CD) 1:100 verdünnen (1 ml werden für einen Streifen benötigt. Dies entspricht 10 µl CJ verdünnt in 990 µl CD).

2. Verteilung des Konjugats:

Pipettieren Sie je 100 µl des verdünnten Konjugats in jede Reaktionsvertiefung. Platte abkleben.

3. Inkubation des Konjugats:

60 ± 5 min bei +37 ± 3°C inkubieren.

WASCHEN:

Nach Absaugen oder Verwerfen der Proben werden sämtliche Vertiefungen 4mal gewaschen. Entfernen der Waschlösung.

III - SUBSTRATZUGABE UND MESSUNG DER ABSORPTION

1. Zugabe des Substrats:

Je 100 µl Substratlösung (PS) in jede Vertiefung pipettieren. Nicht mit Folie bedecken. Vorsichtig schütteln, damit eine gleichmäßige Durchmischung erreicht wird.

2. Inkubation des Substrats:

30 ± 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur (+20 ± 5°C) inkubieren.

3. Zugabe der Stopplösung:

50 µl Stopplösung (S) zugeben. Vorsichtig schütteln, um gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Schaum- oder Blasenbildung muss vermieden werden.

4. Messung der Absorption:

Die Intensität der Färbung wird bichromatisch bei 450/630 nm bestimmt. Gegebenenfalls ist auch die monochromatische Bestimmung bei 450 nm möglich.

Bitte sorgen Sie für eine saubere Unterseite der Testplatte.

VII(1). VALIDIERUNG DES TESTS

Folgende Kriterien müssen erfüllt sein, damit der Test gültig ist:

$$\overline{OD}(N) > 0,5 \text{ und}$$

$$\overline{OD}(P) < 0,8$$

N = negative Kontrolle

P = positive Kontrolle

VIII(1). AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Methode zur Berechnung und Interpretation der Ergebnisse basiert auf folgendem Modell:

$$\text{Log}(Titer) = a + b \times \text{Logit}(SNC) \text{ oder}$$

$$Titer = 10^{(a+b \times \text{Logit}(SNC))}$$

mit

$$SNC = \frac{OD(S) - \overline{OD}(P)}{OD(N) - \overline{OD}(P)}, a = 2,5, \text{ und } b = -0,70$$

Der SNC-Wert (Korrigiertes Verhältnis aus Probe und Negativkontrolle) für jede Kavität wird berechnet und notiert. Dann gilt:

- wenn $SNC_{(1:10000)} < 0,0976$, dann ist der Titer > 15000 Eu (ELISA unit);

- wenn $0,7437 > SNC_{(1:10000)} > 0,0976$, dann folgt

$$Titer = 10 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:10000)})}$$

- wenn $SNC_{(1:10000)} > 0,7437$, und

- wenn $SNC_{(1:1000)} < 0,7437$ dann ist der

$$Titer = 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:1000)})}$$

- wenn $SNC_{(1:1000)} > 0,7437$ und

- wenn $SNC_{(1:100)} < 0,95$, dann ist der

$$Titer = 0,1 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:100)})}$$

- wenn $SNC_{(1:100)} > 0,95$, dann ist der

$$Titer = 0$$

Die Excel-Tabelle, welche die oben beschriebene Berechnung automatisch durchführt, kann von unserer Website:

<http://www.synbiotics.fr/>

herunter geladen werden.

IX(1). HINWEISE ZUR INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Detektion der PCV-2 Antikörper im ELISA ist geeignet, den Antikörperspiegel im Schweineserum zu messen. Das Level der maternalen Antikörper, sowie der Antikörpertiter vor und nach einer Impfung kann herangezogen werden um

1. den geeigneten Impfzeitpunkt festzustellen,
2. die Effizienz der Impfung zu prüfen,
3. Risikopopulationen, also Herden mit keinem oder niedrigem Antikörperspiegel anzuzeigen.

siehe folgende Beispiele

Fig-1

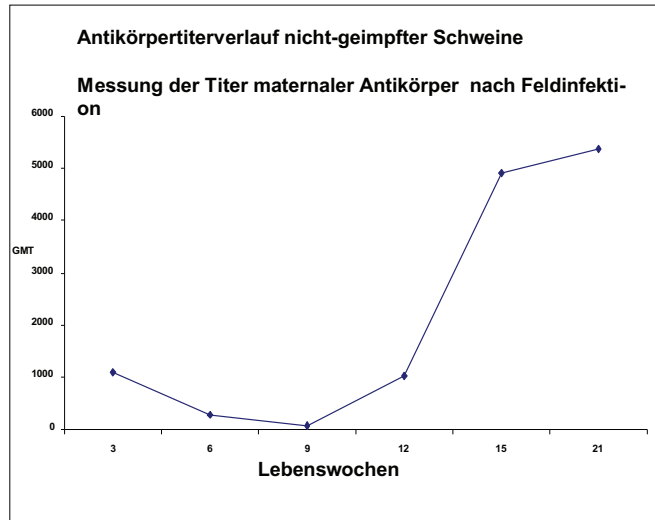
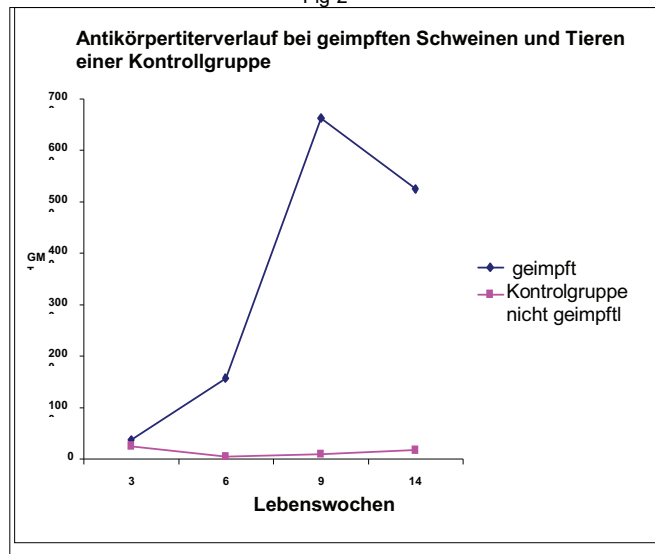


Fig-2



Der PCV2 ELISA ist ein bedeutendes Hilfsmittel zur Messung und Aufrechterhaltung eines hohen Antikörperspiegels in einer Herde, um diese vor einer Feldinfektion zu schützen.

QUALITATIVE METHODE FÜR SERUMPROBEN (2)

V(2).PROBEN

Der Test wird durchgeführt mit Einzelproben aus Serum, die mit Probenverdünnungslösung (SD) 1:100 verdünnt werden.

Hinweise zur Probenlagerung:

Probe	gekühlt (+ 5°C)	gefroren (- 20°C)	Raumtemperatur (+ 23°C)
Serum	max. 7 Tage	ja	nein

VI(2). ANWENDUNG DES TESTS

Bitte befolgen Sie die folgenden Hinweise genau. Verwenden Sie die Negativ- und Positivkontrolle jeweils doppelt für jeden Ansatz oder Platte.

A. VORBEREITUNG

Die Position und Verteilung der Kontrollen und Proben ist genau zu notieren. Die Seren sollten in geeigneten Gefäßen 1:10 vorverdünnt werden; von den Vorverdünnungen wird dann jeweils eine 1:10-Verdünnung in der Testplatte durchgeführt.

B. DURCHFÜHRUNG

I – VERTEILUNG DER KONTROLLEN UND PROBEN

1. Verteilung der Kontrollen:

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

Nach Schütteln der Gefäße geben Sie 100 µl der Negativkontrolle (N) in die Kavitäten A1 und A2. Geben Sie 100 µl der Positivkontrolle (P) in die Kavitäten B1 und B2.

2. Verteilung der Proben:

Pipettieren Sie 100 µl der 1:100 verdünnten Proben in die Kavitäten oder verdünnen Sie die Proben 1:10 direkt in der Testplatte indem Sie 90 µl SD und 10 µl der Vorverdünnungen Kavitäten pipettieren!

Die Teststreifen sollten so in dem Rahmen angeordnet sein, dass ein automatischer Washer, sowie ein ELISA-Reader benutzt werden kann. Verschließen der Kavitäten mit den beiliegenden Folienstreifen Testplatte vorsichtig schütteln!

3. Inkubation der Platte:

60 ± 5 min bei +37 ± 3°C inkubieren.

WASCHEN:

Waschlösung: Verdünnen Sie das 10fach-Konzentrat (W) 1:10 in destilliertem oder entmineralisiertem Wassers.

Nach Absaugen oder Verwerfen der Proben werden sämtliche Vertiefungen 4mal gewaschen. Entfernen der Waschlösung.

II – ZUGABE DES KONJUGATS

1. Vorbereitung des Konjugats:

Peroxidase-Konjugat (CJ) mit Konjugat-Verdünnungslösung (CD) 1:100 verdünnen (1 ml wird für einen Streifen benötigt. Dies entspricht 10 µl CJ verdünnt in 990 µl CD).

2. Verteilung des Konjugats:

Pipettieren Sie je 100 µl des verdünnten Konjugats in jede Reaktionsvertiefung; Platte mit Folie abdecken.

3. Inkubation des Konjugats:

60 ± 5 min bei +37 ± 3°C inkubieren.

WASCHEN:

Nach Absaugen oder Verwerfen der Proben werden sämtliche Vertiefungen 4mal gewaschen. Entfernen der Waschlösung.

III – SUBSTRATZUGABE UND MESSUNG DER ABSORPTION

1. Zugabe des Substrats:

Je 100 µl Substratlösung (PS) in jede Vertiefung pipettieren. Nicht mit Folie bedecken. Vorsichtig schütteln, damit eine gleichmäßige Durchmischung erreicht wird.

2. Inkubation des Substrats:

30 ± 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur (+20 ± 5°C) inkubieren.

3. Zugabe der Stopplösung:

50 µl Stopplösung (S) zugeben. Vorsichtig schütteln, um gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Schaum- oder Blasenbildung muss vermieden werden.

4. Messung der Absorption:

Die Intensität der Färbung wird bichromatisch bei 450/630 nm bestimmt. Gegebenenfalls ist auch die monochromatische Bestimmung bei 450 nm möglich.

Bitte sorgen Sie für eine saubere Unterseite der Testplatte.

VII(2). VALIDIERUNG DES TESTS

Folgende Kriterien müssen erfüllt sein, damit der Test gültig ist:

$$\overline{OD}(N) > 0,8 \text{ und}$$

$$\overline{OD}(P) < 0,5$$

N = negative Kontrolle

P = positive Kontrolle

VIII(2). AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bestimmung des Verhältnisses von Probe/negativer Kontrolle

$$S / N = \frac{OD(S)}{\overline{OD}(N)}$$

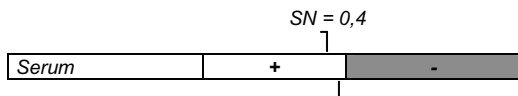
$\overline{OD}(S)$ = Absorptionswerte der Proben

$\overline{OD}(N)$ = Mittelwert der Absorptionswerte der negativen Kontrollen

Proben, für die $SN \leq 0,4$ ist, gelten als positiv bezüglich des Vorhandenseins von PCV2-Antikörpern im getesteten Serum.

Proben, für die $SN > 0,4$ ist, gelten als negativ bezüglich des Vorhandenseins von PCV2-Antikörpern im getesteten Serum.

Interpretation des Ergebnisses



Für weitere Fragen wenden Sie sich bitte an uns:

SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
69367 LYON Cedex 07 – France
Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10
www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

NUR IN DER VETERINÄRMEDIZIN ZU VERWENDEN/
GEBRAUCH NUR IN VITRO

Ausgewiesene Stellen für den Umweltschutz