IDEXX **ALV Ag Česká verze**

**Testovací souprava k prokázání přítomnosti antigenů aviární leukózy**

Pro veterinární užití.

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX ALV Ag je enzymatický imunologický test od firmy IDEXX, sloužící k detekci antigenů viru aviární leukózy p27 v kuřecím séru, výtěrech z kloaky nebo vzorcích albuminu.

**Obecné informace**

Viry aviární leukózy (ALV) způsobují řadu neoplastických onemocnění včetně lymfoidní leukózy, erytroblastózy, myelocytomatózy a dalších1. Hlavní antigen, p27, je vysoce zachován mezi všemi ALV podskupinami (A, B, C, D, E a J) a jeho detekce je základem testu ALV-Ag.
Exogenní ALV mohou být přenášeny horizontálně z jedince na jedince, a to přímým nebo nepřímým kontaktem, nebo vertikálně z infikované slepice na její potomky.
Virémie slepice je silně propojena s kongenitální transmisí viru prostřednictvím přenosu do vaječného bílku. Sekvence viru endogenní leukózy jsou přítomny v genomu většiny normálních linií kuřat2.

**Popis a principy**

Tento test je navržen k detekci p27, antigenu běžného pro všechny podskupiny ALV včetně endogenních virů. Doporučeným typem vzorku je lehký albumin a vzorky výtěrů z kloaky.
**Ačkoli sérum bylo validováno pro použití v ALV-Ag tesu, není doporučováno k detekci exogenních virů kvůli možné interferenci s endogenními sekvencemi3.**
Byl vyvinut mikrotitrační formát, který využívá destičky s 96 jamkami potažené protilátkou proti p27. Vzorek p27 vytvoří komplex s nanesenou protilátkou. Po vymytí nenavázaného materiálu je přidán anti-p27:HRPO konjugát, který se naváže na p27 uchovaný v jamce. V závěrečném kroku testu je nenavázaný konjugát vymyt a do jamky se přidá enzymový substrát.
Následný vývoj zabarvení může souviset s množstvím p27 přítomným ve vzorku. Vzhledem k viskozitě vzorků albuminu je jako druhá procedura v této příbalové informaci popsán modifikovaný protokol pro zacházení se vzorky a mytí.

 ** Činidla**  Objem

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená protilátkou anti-p27 | 5 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek - inaktivovaný virus v pufru s proteinovými stabilizátory; konzervováno Proclinem™150 | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek - pufr s proteinovými aditivy, nereagující s p27; konzervováno Proclinem™150 | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Konjugát - (králičí) anti-p27: HRPO konjugát; konzervováno Proclinem™150 | 1 x 50 ml |
| 5 | Roztok k ředění vzorků - pufr se stabilizátory proteinů; Proclinem™150 | 1 x 235 ml |
| A | TMB substrát  | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok  | 1 x 60 ml |
| C | Albuminový promývací roztok (20X) - (pro albuminový mycí protokol); konzervováno Proclinem™150 | 1 x 235 ml |

**Poznámka:** V tabulce na konci tohoto dokumentu je uveden popis symbolů používaných v příbalové informaci a na etiketě této testovací sady.

**Uchovávání**

Činidla uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Pokud jsou činidla správně uchovávána, zůstávají stabilní až do data exspirace.

**Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy**

* Přesné pipety nebo pipety pro hromadné pipetování
* Jednorázové pipetovací špičky
* Válec na promývací roztok opatřený stupnicí
* Mikrodestička s 96 jamkami (vybavená filtrem s vlnovou délkou 650 nm)
* Promývačka mikrotitračních destiček (manuální, poloautomatická nebo automatická)
* Pro přípravu činidel používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními. Antigen, užitý v této sadě nemusí být zcela inaktivovaný.
* Při manipulaci se vzorky a činidly používejte ochranné rukavice / ochranné oblečení / ochranné brýle nebo obličejový štít.
* Další informace najdete v materiálovém bezpečnostním listu.
* Varování a upozornění týkající se činidel jsou uvedena na konci této příbalové informace.

**Laboratorní postupy**

* Optimálních výsledků dosáhnete díky striktnímu dodržování tohoto protokolu. K zajištění maximální přesnosti během celého postupu je nutné pečlivé pipetování, dodržování časových intervalů a promývání. Pro každý vzorek a kontrolní test používejte novou špičku pipety.
* TMB roztok nevystavujte silnému světlu nebo oxidačním činidlům. Při práci s TMB roztokem používejte skleněné nebo plastové vybavení.
* Všechny odpadní materiály je nutné před likvidací řádně dekontaminovat. Jednotlivé materiály likvidujte v souladu s místními, regionálními nebo národními předpisy.
* Je třeba také dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci součástí sady. Použitá činidla nenalévejte zpět do nádobek.
* Sadu nepoužívejte po vypršení data exspirace.

**Příprava vzorků**

***Albumin*** - naberte lehký albumin a přidejte přímo na destičku bez předchozího ředění. Zmrazte/rozmrazte vzorek pro redukci viskozity.

***Výtěry z kloaky*** - umístěte tampon s výtěrem do 1 ml kultivačního média nebo ředicího roztoku a zmrazte. Před zahájením testu zahřejte vzorek na 18–26°C a nechte usadit hrubé částice. Pipetujte 100 ml supernatantu přímo na ELISA destičku.

***Sérum*** - pro obecnou detekci p27 se vzorek přidává přímo do jamky bez předchozího ředění. Testování vzorků séra na exogenní odvozený p27 není doporučeno vzhledem k interferenci s endogenním virem.

**Postup testu (pro vzorky kromě albuminu)**

Všechna činidla musí před použitím dosáhnout teploty 18–26°C. Míchejte jemným obracením nebo kroužením.

1. Připravte si potažené destičky a zaznamenejte umístění vzorku.

2. Přeneste 100 μl NEŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NC) do duplicitních jamek.

3. Přeneste 100 μl NEŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PC) do duplicitních jamek.

4. Přeneste 100 μl testovaného vzorku do určené jamky. Vzorky lze testovat v duplikátech, ale jen jedna jamka je také přijatelná. Žádný vzorek se před testováním NEŘEDÍ.

5. Zakryjte destičku a inkubujte 60 minut (± 5 minut) při 18–26°C.
6. Odstraňte roztok a každou jamku 3-5x promyjte přibližně 350 µl destilované nebo deionizované vody. Destička nesmí mezi umýváním a před přidáním dalšího činidla vyschnout. Po posledním vymytí odstraňte zbývající promývací tekutinu z každé destičky poklepáváním na savý materiál.

7. Přidejte 100 μl konjugátu do každé jamky.

8. Zakryjte destičku a inkubujte 60 minut (± 5 minut) při 18–26°C.

9. Opakujte krok č. 6.

10. Přidejte 100 μl TMB substrátu do každé jamky.

11. Zakryjte destičku a inkubujte 15 minut (±1 min.) při 18–26°C.

12. Přidejte 100 μl zastavovacího roztoku do každé jamky.

13. Odečtěte a zaznamenejte výsledky při vlnové délce 650 nm, A (650).

**Albuminový mycí protokol** - vzorky lehkého albuminu je někdy obtížné zcela vymýt z jamek, pokud se sleduje standardní procedura mytí vodou. V této sadě je pro použití s albuminovými vzorky přiložen mycí koncentrát (20x).

**Příprava mycího roztoku** - mycí koncentrát (20X) se zahřeje na 18–26°C a promíchá pro rozpuštění sražených solí. Albuminový mycí roztok se připraví zředěním mycího koncentrátu v poměru 1:20 (např. 20 ml mycího koncentrátu a 380 ml vody pro jednu destičku).

**Albuminová mycí procedura** - testovací postup s albuminem se provádí stejně jako je popsáno výše, s výjimkou mycích kroků (č. 6 a 9). Odsajte kontrolní roztok a testované vzorky albuminu z jamek a vymyjte asi 350 μL mycího roztoku. Nechte jamky odmáčet po dobu 2 minut, odsajte tekutinu a čtyřikrát zopakujte už bez dvouminutového namáčení.

14. **Výpočty:**

**Kontrolní vzorky**

 

**Kritéria validity**

 

Při neplatnosti výsledků je třeba předpokládat chybu v technice provedení. Doporučuje se důkladně znovu prostudovat příbalovou informaci a test provést znovu.

**Vzorky**

S/P = Průměr vzorku – NC~~x~~

 PC~~x~~ – NC~~x~~

Přítomnost nebo nepřítomnost antigenu p27 je určena porovnáním hodnoty absorbance A (650) vzorku s průměrem pozitivní kontroly. Pozitivní kontrolní vzorek je standardizován a reprezentuje významnou hladinu antigenů (zhruba 10 ng/ml). Relativní hladinu antigenu ve vzorku lze určit přepočtem na pozitivní poměr S/P.

15. **Interpretace**

 Negativní Pozitivní

** **

**Poznámka:** Společnost IDEXX má přístrojové a softwarové systémy, které vypočítávají výsledky a poskytují souhrny údajů.

Bibliografie

1. Payne LN, Fadly AM, 1997. Nemoci ze skupiny leukóz a sarkomů u drůbeže, 10. vydání, B.W. Calnek ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1997:414-466.

2. Crittenden LB, 1981. Geny exogenních a endogenních virů leukózy - přehled. Aviární patologie. 1981;10:101-112.

3. Payne LN, Gillespie AM, Howes K, 1993. Nevhodnost kuřecího séra pro detekci exogenního ALV skupinově specifickou antigenovou metodou ELISA. Veterinární záznamy. Květen 1993:555-557.

**Kontakty pro technickou podporu:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895

IDEXX Evropa Tel: +800 727 43399

Obraťte se na manažera nebo distributora společnosti IDEXX pro Vaši oblast nebo navštivte naši webovou stránku: [www.idexx.com/production/contactlpd](http://www.idexx.com/production/contactlpd)

VLN/PCN: 313/5007.00

\*IDEXX a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky

společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností ve Spojených státech amerických a/nebo v jiných zemích.

©2020 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved. (Všechna práva vyhrazena.)

**Upozornění**

****

**Pozitivní kontrolní vzorek / Negativní kontrolní vzorek / Konjugát / Roztok pro ředění vzorků –** Může vyvolat alergickou kožní reakci. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Zamezte vdechování aerosolů/par. Používejte ochranné rukavice. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody s mýdlem. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.



**TMB substrát -** Může vyvolat alergickou kožní reakci. Zamezte vdechování aerosolů/par. Používejte ochranné rukavice. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody s mýdlem. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

**Popis symbolů**

 Kód šarže

 Sériové číslo

 Katalogové číslo

 Diagnostika in vitro

 Autorizovaný zástupce v Evropském společenství

 Pozitivní kontrolní vzorek

 Negativní kontrolní vzorek

 Použijte do

 Datum výroby

 Výrobce

 Teplotní omezení

 Čtěte návod na použití

****  Větší změna v příbalové informaci

Výrobce

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Zástupce pro EU a držitel rozhodnutí o schválení

IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
Nizozemí

idexx.com

Číslo schválení: 127-16/C

