**Testovací sada na průkaz protilátek proti onemocnění Maedi-Visna/CAEV**

**Pouze k veterinárnímu užití.**

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening je enzymatický imunologický test firmy IDEXX sloužící k detekci protilátek proti onemocnění Maedi-Visna/CAEV v individuálních vzorcích séra ovcí a koz.

**Obecné informace**

Maedi-Visna je virové onemocnění ovcí, způsobené lentiviry. Je charakterizováno progresivní intersticiální pneumonií nebo meningoencefalitidou. Někdy je pozorována také artritida a chronická mastitida. Onemocnění nejčastěji postupuje pomalu, avšak nevratně. Jeho ekonomické dopady jsou nepřehlédnutelné. Virová artritida a encefalitida koz (CAEV) je onemocnění dospělých koz, způsobené RNA lentiviry a vedoucí k projevům artritidy (otoků kolenních kloubů) a mastitidy. Vzácněji může CAEV způsobit encefalitidu u kůzlat. CAEV je onemocnění s pomalým, ale nevratným postupem a nepopiratelnými ekonomickými dopady. Jelikož v současnosti neexistuje na tato onemocnění žádná léčba ani vakcína, eradikační programy se zakládají na časné detekci v kombinaci s drakonickými sanitárními opatřeními (eliminací zvířat přenášejících virus). Technikou nejsnáze aplikovatelnou ve velkém měřítku je sérologický screening. Původně se sérologická diagnostika zakládala na imunodifuzi v agarovém gelu, nyní se provádí pomocí metody ELISA, která nabízí snadnější zacházení i interpretaci a také lepší detektabilitu. Tato sada využívá nepřímou ELISA metodu, založenou na využití imunogenního peptidu transmembránového proteinu (TM, ENV gen) a rekombinantního proteinu p28, který vstupuje do složení virové kapsidy (gen GaG). Anti-p28 protilátky se mohou vyskytnout o něco později než ty proti proteinům virového obalu. Využití tohoto vysoce stabilního proteinu umožňuje sérologickou detekci velmi širokého spektra sérologických variant.

**Popis a principy**

Mikrotitrační destičky jsou potaženy antigenem Maedi-Visna/CAEV. Testované vzorky se zředí a inkubují v jamkách destičky. Během inkubace testovaného vzorku v potažených jamkách vytváří specifické protilátky proti onemocnění Maedi-Visna/CAEV imunokomplexy s Maedi-Visna/CAEV antigeny. Po vymytí nenavázaného materiálu se přidá anti-ruminantní IgG konjugát enzymu a protilátky, který se naváže na jakýkoli přítomný imunokomplex antigen-protilátka. Nenavázaný konjugát se vymyje a přidá se enzymový substrát (TMB). V přítomnosti enzymu je substrát oxidován a vzniká modrá sloučenina, která po blokování zežloutne. Následný rozvoj zbarvení je přímo úměrný množství protilátek proti onemocnění Maedi-Visna/CAEV přítomnému v testovaném vzorku. Výsledek se získá porovnáním optické hustoty vzorku s průměrnou optickou hustotou pozitivního kontrolního vzorku.

Reagencie Objem

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destičky potažené antigenem Maedi-Visna/CAEV | 10 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek  | 2 x 0,5 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek  | 2 x 0,5 ml |
| 4a | Koncentrovaný konjugát (100x) | 1 x 1,5 ml |
| 4b | Ředicí pufr č. 1 | 1 x 120 ml |
| 5 | Ředicí pufr č. 4 | 2 x 120 ml |
| A | TMB substrát č. 12 | 1 x 120 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 120 ml |
| C | Mycí koncentrát (20x) | 2 x 100 ml |
| Další součásti sady: Sáček se zipovým uzávěrem | 1 |

Poznámka: Popis symbolů použitých v návodu a popiscích této soupravy naleznete na konci letáku.

**Uchovávání**

Reagencie uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Reagencie jsou za předpokladu řádného skladování stabilní do data exspirace.

**Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy**

* Přesné pipety nebo multikanálové pipety
* Jednorázové pipetovací špičky
* Odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku
* Čtečka mikrodestiček s 96 jamkami (vybavená filtrem s vlnovou délkou 450 nm)
* Mycí zařízení na mikrodestičky (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu reagencií používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka
* Kryty na mikrodestičky (víčka, hliníková nebo přilnavá fólie)
* Třepačka mikrodestiček
* Inkubátor schopný udržet teplotu +37°C (±3°C)

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními.
* Při manipulaci se vzorky a reagenciemi používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí nebo obličeje.
* Další informace najdete v materiálových bezpečnostních listech.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití reagencií najdete na konci tohoto letáku.

**Laboratorní praxe**

* Pro dosažení optimálních výsledků přesně dodržujte tento protokol. K zachování přesnosti a správnosti je nezbytné pečlivé pipetování, měření času a promývání během postupu. Pro každý vzorek a kontrolu použijte vždy novou pipetovací špičku.
* Roztok TMB nevystavujte silnému světlu nebo jakýmkoli oxidačním činidlům. Pro manipulaci s roztokem TMB používejte čisté skleněné nebo plastové nádoby.
* Všechny odpady je třeba před likvidací řádně dekontaminovat. Obsah likvidujte v souladu s místními, regionálními a státními předpisy.
* Snažte se zabránit kontaminaci složek soupravy. Nenalévejte nepoužité reagencie zpět do nádob.
* Nepoužívejte soupravu po datu exspirace.

**Příprava reagencií**

**Mycí roztok**

Koncentrát mycího roztoku (20x) musí být před užitím zředěn destilovanou/deionizovanou v poměru 1:20 (např. 15 ml koncentrátu (20x) na 285 ml destilované vody). Tento roztok bude dále nazýván „mycí roztok“.

Poznámka: Koncentrát mycího roztoku (20x) by měl být zahřát na teplotu 18–26°C a dobře promíchán, aby se rozpustily veškeré sražené soli. Mycí roztok je při teplotě 2–8°C stabilní po dobu 3 dnů.

**Konjugát**

Koncentrovaný konjugát (100x) musí být zředěn ředicím pufrem č. 1 v poměru 1:100.

Poznámka: Zředěný roztok konjugátu je při teplotě 18–26°C stabilní po dobu 8 hodin.

**Postup testu**

Všechny reagencie použité v tomto testu musí mít teplotu 18–26°C. Reagencie se míchají jemným obracením nebo kroužením.

1. Připravte si potažené mikrodestičky a zaznamenejte umístění vzorků. Pokud používáte pouze část destičky, oddělte jen takový počet jamek, který odpovídá počtu testovaných vzorků. Zbývající jamky umístěte spolu s desikantem do přiloženého sáčku se zipovým uzávěrem a uložte zpět do teploty 2-8°C.

2. Dejte 190 μl ředicího pufru č. 4 do každé jamky.

3. Dejte 10 μl NEŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK) do duplicitních jamek.

4. Dejte 10 μl NEŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK) do duplicitních jamek.

5. Do zbývajících jamek dejte vždy 10 μl NEŘEDĚNÉHO testovaného vzorku na jamku.

6. Promíchejte obsah jamek jemným poklepáváním nebo pomocí třepačky destiček.

7. Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 1 hodiny (±5 min.) při teplotě +37°C (± 3°C).

8. Odstraňte roztok a každou jamku 3x promyjte přibližně 300 µl mycího roztoku. Destička nesmí mezi umýváním a před přidáním příští reagencie vyschnout. Po posledním promytí odstraňte zbývající mycí tekutinu z každé destičky poklepáním na savý materiál.

9. Přidejte 100 μl ZŘEDĚNÉHO konjugátu do každé jamky.

10. Inkubujte po dobu 30 minut (±3 min.) při teplotě +37°C (± 3°C).

11. Opakujte krok č. 8.

12. Přidejte 100 μl TMB substrátu č. 12 do každé jamky.

13. Inkubujte 20 minut (±3 min.) při 18–26°C mimo dosah přímého světla.

14. Přidejte 100 μl zastavovacího roztoku č. 3 do každé jamky.

15. Změřte a zaznamenejte hodnoty optické hustoty vzorků a kontrol při vlnové délce 450 nm.

Poznámka: Při použití robotických systémů umožňuje inkubace mikrodestiček v inkubačních komůrkách pracovat bez krytů destiček. Využívání robotiky zároveň není kompatibilní s jemným poklepáváním nebo otíráním mikrotitračních destiček. Před odečítáním výsledků lze destičky uchovávat ve tmě až 1 hodinu.

16. **Výpočty:**

**Kontrolní vzorky**

NK~~x~~ = NK1 A(450) + NK2 A(450) PK~~x~~ = PK1 A(450) + PK2 A(450)
 2 2

**Kritéria validity**

PKx ≥ 0,350 PKx / NKx ≥ 3,50

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

**Vzorky**

S/P % = 100 x A(450) vzorku – NK A(450)

 PK~~x~~ – NK~~x~~

17. **Intepretace**

Negativní: S/P % ≤ 110

Suspektní: 110 < S/P % < 120

Pozitivní: S/P % ≥ 120

Poznámka: Společnost IDEXX má k dispozici přístrojové a softwarové systémy pro výpočet výsledků a poskytování souhrnů dat.

**Technická podpora:**

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

\*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.

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**Upozornění**

**H316/H319/P280/P332+P313/P337+P313**

**Pozitivní kontrola/Negativní kontrola –** Způsobuje mírné podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**H315/H319/P280/P332+P313/P337+P313**

**TMB substrát** **–** Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**H302/H315/H317/H319/H335/P280/P333+P313/P337+P313/P363**

**Zastavovací roztok:** Zdraví škodlivý při požití. Dráždí kůži. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné podráždění očí. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Používejte ochranné rukavice / ochranné brýle / obličejový štít.

Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte.

**Popis symbolů:**

Číslo šarže

Sériové číslo

Katalogové číslo

Diagnostika in vitro

Autorizovaný obchodní zástupce pro Evropu

Pozitivní kontrola

Negativní kontrola

Datum spotřeby

Datum výroby

Výrobce

Teplotní omezení

Viz návod k použití

Zásadní změna v návodu k použití

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive

Westbrook, Maine 04092

USA

Výrobce

IDEXX Montpellier SAS

326 rue de la Galéra

34090 Montpellier

Francie

Držitel rozhodnutí o schválení a zástupce pro EU

IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofdorp

Nizozemsko

Číslo schválení: 005-06/C