**Testovací sada na průkaz antigenů viru bovinní virové diarey (BVDV)/Serum plus**

Pouze pro veterinární použití.

**Název a zamýšlené použití**

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus je enzymatický imunologický test od firmy IDEXX, sloužící k detekci antigenů BVDV v kravském séru, plazmě, plné krvi a výřezech tkáně z ušního boltce.

**Obecné informace**

Virus bovinní virové diarey (BVDV), BDV (Border disease virus) a virus klasického moru prasat (CSFV) společně tvoří rod Pestivirus v rámci čeledi Flaviviridae. BVDV patří k nejvýznamnějším virovým patogenům dobytka a způsobuje značné škody masnému i mléčnému průmyslu po celém světě. Mezi typické příznaky BVDV patří průjem, horečka, následované snížením produkce mléka. Imunosupresivní efekt BVDV může navíc umocnit infekci jinými mikroorganismy. U infikovaných březích krav virus prostupuje přes placentu a způsobuje reprodukční ztráty prostřednictvím abortů, porodů mrtvě narozených telat nebo telat, která záhy umírají. Některá telata, která přežijí, jsou k viru imunotolerantní a po celý život vylučují značná množství infekčního viru. Identifikace těchto perzistentně infikovaných zvířat je nutná pro přerušení cyklu infekce ve stádě.

Perzistentně infikovaná zvířata často umírají v prvních dvou letech života na „slizniční chorobu“. Následkem intrauterinní infekce je BVDV častým kontaminantem biologických produktů, jako jsou vakcíny a léčiva. BVDV vyvolává podobné syndromy u ovcí, zatímco CSFV stojí (vzhledem ke své vysoké patogenitě a schopnosti způsobit rozsáhlou mortalitu) za značnými ztrátami v chovu prasat.

**Popis a principy**

IDEXX BVDV Ag/Serum plus je enzymatický imunologický test navržený pro detekci antigenů BVDV (Ag) v séru, plazmě, plné krvi a výřezech tkáně z ušního boltce u hovězího dobytka. Mikrotitrační formát byl nastaven imobilizací specifických monoklonálních protilátek proti BVDV (Erns) na destičkách. BVDV Ag ze vzorku jsou zachyceny na těchto destičkách. Po inkubaci testovacího vzorku v jamce jsou zachycené BVDV Ag detekovány pomocí specifických protilátek a konjugátu křenové peroxidázy. Následně se nenavázaný konjugát vymyje a přidá se substrát/chromogenní roztok. V přítomnosti enzymu je substrát konvertován na produkt, který reaguje s chromogenem a vytváří modré zabarvení. Po přidání zastavovacího roztoku vznikne žluté zabarvení. Absorbance se změří spektrofotometrem. Upravená optická hustota vzorku se vypočítá odečtením absorbance testovaného vzorku od absorbance negativní kontroly.

Činidla Objem

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená Anti-Erns mAb | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Konjugát | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Pufrační roztok pro výřezy tkáně z ušního boltce | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | TMB substrát č. 12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Mycí koncentrát (10 X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Detekční roztok | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Další komponenty: sáček se zipovým uzávěrem | | 1 | 1 | - |

**Poznámka:** Popis symbolů použitých v této příbalové informaci najdete v tabulce na konci letáku.

**Uchovávání**

Činidla uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Činidla 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 se stupnicí pro přípravu mycího roztoku
* Mikrodestička s 96 jamkami (vybavená filtrem s vlnovou délkou 450 nm nebo duálním filtrem pro 450 a 650 nm)
* Mycí zařízení na mikrodestičku (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu činidel používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Materiál na zakrytí destiček (víčka, aluminiová nebo přilnavá fólie)
* Odstředivka (zrychlení 2000 x g)
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka
* Třepačka na mikrodestičky
* Vlhká komůrka nebo inkubátor schopný udržet teplotu +37°C (±3°C)
* Zkumavky pro namáčení vzorků tkáně

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními.
* Při manipulaci se vzorky a činidly používejte ochranné rukavice / ochranné oblečení / ochranu očí nebo obličeje.
* Další informace najdete v materiálových bezpečnostních listech.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití činidel najdete na konci této příbalové informace.

**Laboratorní postupy**

* 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.
* TMB roztok nevystavujte silnému světlu nebo jakýmkoli oxidačním činidlům. Pro manipulaci s TMB roztokem 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 nepoužitá činidla zpět do nádob.
* Nepoužívejte soupravu po datu exspirace.

**Příprava činidel**

**Mycí roztok**

Mycí koncentrát (10X) zahřejte na 18–26°C a promíchejte, aby se rozpustily sražené soli. Mycí koncentrát (10X) musí být před použitím zředěn destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1 ku 10 (např. 30 ml mycího koncentrátu (10X) a 270 ml vody na každou testovanou destičku). Pokud je připravován za sterilních podmínek, může se mycí roztok uchovávat týden při 2–8°C.

**Příprava vzorků**

Lze testovat čerstvé nebo zmražené sérum, plazmu, plnou krev nebo výřezy tkáně z ušního boltce.

Vzorky výřezů tkáně z ušního boltce

* Použijte vzorky ve tvaru kruhu o průměru 2-3 mm (získané např. při aplikaci ušních štítků pomocí přiloženého zařízení na odběr vzorků).
* Je-li to možné, mohou vzorky zůstat v odběrovém zařízení pro inkubaci. Poznámka: lze testovat čerstvé, vlhké, sušené i zmražené vzorky tkáně.
* Ke vzorku přidejte 150–250 μL pufru pro namáčení vzorků tkáně z ušního boltce IDEXX. Přesvědčte se, že je vzorek kompletně ponořen v roztoku (jemným poklepáním nebo promícháním).
* Vzorek nechte namáčet v namáčecím pufru mezi 12-24 hodinami při 18–26°C, nebo až 72 hodin přes víkend při 18–26°C (nebo při 2–8°C). Aby se zamezilo vypařování pufru, doporučuje se inkubovat v uzavřených zkumavkách nebo ve vlhké komůrce.
* Pro účely testu odeberte 50 μL namáčecího pufru. **Poznámka:** Zbývající pufr může být po vyjmutí vzorku tkáně zmražen (-20°C) a uložen pro pozdější opakování testu.

**Postup testu**

Všechna činidla použitá v tomto testu musí mít teplotu 18–26°C. Činidla se míchají jemným obracením nebo kroužením.

1. Připravte si potažené destičky a zaznamenejte umístění vzorku. Používáte-li pouze část destičky, oddělte množství jamek odpovídající počtu testovaných vzorků. Zbylé jamky uložte spolu s desikantem do přiloženého sáčku se zipovým uzávěrem a vraťte do chladna (2–8°C).

2. Do každé jamky přeneste 50 μl detekčních protilátek.

3. Do určených jamek přeneste 50 μl negativního kontrolního vzorku (NC).

4. Do určených jamek přeneste 50 μl pozitivního kontrolního vzorku (PC).

5. Do zbývajících jamek přeneste 50 μl testovaného vzorku.

6. Promíchejte obsah mikrojamek jemným poklepáním na destičku, nebo použijte třepačku.

7. Inkubujte po 2 hodiny (±5 min.) při 37°C (±3°C), nebo přes noc (12 - 18 hodin) při 2–8°C. Při použití kteréhokoli postupu by měly být destičky těsně uzavřeny, nebo inkubovány ve vlhké komůrce, aby se zabránilo vypařování.

8. Odstraňte roztok a každou jamku 5x propláchněte asi 300 μl mycího roztoku. Mezi vymýváním a před přidáním dalšího činidla nenechte destičku vyschnout. Pro odstranění zbylého mycího roztoku, po posledním vymytí destičkou, poklepejte na savý materiál. **Důležité**! Pečlivě zkontrolujte, zda na stěnách a okrajích jamky nezůstaly stopy krve. Před přistoupením k dalšímu kroku mohou být potřeba další 2-3 omytí pro odstranění krve.

9. Do každé jamky přeneste 100 μl konjugátu.

10. Inkubujte po dobu 30 minut (±2 min.) při 18–26°C.

11. Opakujte krok č. 8.

12. Do každé jamky přidejte 100 μl TMB substrátu č. 12.

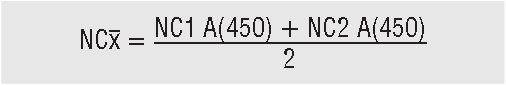
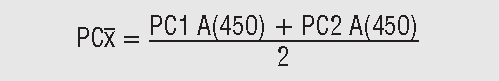
13. Inkubujte po dobu 10 minut (±1 min.) při 18–26°C.

14. Do každé jamky přidejte 100 μl zastavovacího roztoku č. 3.

15. Změřte a zaznamenejte absorbanci vzorků a kontrolních vzorků při 450 nm nebo použijte duální vlnovou délku 450 nm a 650 nm.

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

**Vzorky**

~~~~

Přítomnost nebo nepřítomnost BVDV antigenu je určena upravenou hodnotou optické hustoty (S-N) každého vzorku.

17. Interpretace:

**Vzorky séra, plazmy a plné krve:**

Negativní Pozitivní

Pozitivní výsledky získané tímto testem jsou platné pro telata jakéhokoli věku. Cirkulující vysoký titr maternálních protilátek proti BVDV může interferovat s detekcí BVDV antigenu v séru, plazmě a plné krvi. Detekce BVDV antigenu v séru, plazmě a plné krvi může být méně senzitivní po příjmu protilátek v kolostru. Po příjmu kolostra se mohou vyskytovat falešně negativní výsledky („diagnostická mezera“). Pro vyloučení vlivu kolostrálních protilátek se doporučuje testovat telata před příjmem kolostra. Negativní výsledky u telat po příjmu kolostra by měly být potvrzeny přetestováním po 30. dnu života. Pokud se liší od tohoto popisu, zachovávejte předpisy platné ve vaší zemi.

**Vzorky výřezů tkáně z ušního boltce:**  
Negativní Suspektní Pozitivní

**Suspektní** vzorky se doporučuje přetestovat použitím dalších 50 μl stejného namáčecího pufru. Zbývá-li méně než 50 μl, lze testovat znovu pomocí nového namáčení vzorku tkáně (viz Příprava vzorků). Je-li vzorek znovu suspektní, doporučuje se odebrat vzorek krve a testovat metodou ELISA v testu IDEXX BVDV Ag/Sérum Plus, pomocí izolace viru nebo PCR testem na BVDV. Jsou-li jakékoli pochyby o stavu hodnotného živého zvířete s pozitivním výsledkem, testujte znovu s dalším vzorkem odebraným 7-14 dní po odebrání prvního vzorku pro potvrzení perzistentní infekce. Doporučujeme potvrzovat výsledky získané testováním plné krve pomocí testu na séru nebo plazmě stejného zvířete. Při testování vzorků výřezů tkáně z ušního boltce se diagnostická mezera nevyskytuje.

**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)

\*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.

©2019 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved. (Všechna práva vyhrazena.)

**Upozornění**

  
**Pozitivní kontrola/Mycí koncentrát** - obsahuje kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

  
**Konjugát** - způsobuje mírné podráždění pokožky. Pokud se vyskytne podráždění pokožky: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Obsahuje kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

  
**Namáčecí pufr pro vzorky výřezů tkáně z ušního boltce** - způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné brýle. Pokud podráždění přetrvává, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Obsahuje kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

**TMB Substrate** − způsobuje podrážení pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné rukavice/brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvá-li podráždění očí, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření

**Detekční protilátky** - způsobuje mírné podráždění pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné rukavice/brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření Přetrvává-li podráždění očí: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření Obsahuje kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

**Zastavovací roztok** - škodlivý při požití. Způsobuje podráždění pokožky. Může způsobit alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné poškození očí. Noste ochranné rukavice/brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky/výskytu vyrážky: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Kontaminovaný oděv před novým použitím sundejte a vyperte. Obsah zlikvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

**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 návodu na použití

Výrobce

IDEXX Switzerland GmbH  
Stationstrasse 11  
Liebefeld-Bern, CH-3097  
Švýcarsko

Zástupce pro EU a držitel rozhodnutí o schválení

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

idexx.com

Číslo schválení: 272-01/C

