**Testovací souprava k prokázání protilátek proti viru parainfluenzy 3 (PI3)**

Pouze k veterinárnímu užití

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX PI-3 je enzymatický imunotest od firmy IDEXX, sloužící k detekci protilátek proti viru parainfluenzy 3 (PI3) v individuálních vzorcích bovinního séra a plazmy.

**Obecné informace**

Virus parainfluenzy 3 (PI3) je paramyxovirus, zodpovídající za respirační onemocnění mladého skotu. Nejčastěji se sdružuje s dalšími bakteriemi, jako je například *Pasteurella multocida, Mycoplasma bovis* atd. nebo s jinými viry (BVDV, BHV-1…). Klinické příznaky jsou nespecifické: infekce dolních cest dýchacích, hypertermie, kašel, posmrkávání, dyspnoe a poruchy trávení. Pro identifikaci původce a potvrzení detekce sérokonverze jsou tedy nezbytné laboratorní testy.

**Popis a principy**

Jamky mikrotitrační destičky jsou střídavě pokryty kontrolním antigenem (-Ag) a antigenem PI3 (+Ag). Vzorky určené k testování se zředí a inkubují v jamkách. Během inkubace testovaného vzorku se specifické protilátky proti PI3 navážou na antigen v +Ag jamkách a vytvoří na povrchu jamek imunokomplexy antigen-protilátka. Nespecifické navázání se vyskytne ve stejném rozsahu v jamkách potažených -Ag a +Ag. Po vymytí nenavázaného materiálu se přidá enzymový konjugát protilátek proti ruminantnímu IgG, který se naváže na jakýkoli 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 přímo souvisí s množstvím protilátky proti PI3 přítomné v testovaném vzorku. Hodnota celkové extinkce (Net Extinction, NE) reprezentuje množství navázaných specifických protilátek. NE se získává odečtením hodnoty optické hustoty vzniklé v jamkách obsahujících -Ag od optické hustoty vzniklé v jamkách obsahujících +Ag, do nichž byly přidány stejné vzorky (kontroly a vzorky). Výsledek se získává porovnáním NE vzorku s průměrnou hodnotou NE pozitivní kontroly.

**Činidla** **Objem**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená antigenem PI3 | 2 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek | 1 x 0,5 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 0,5 ml |
| 4a | Koncentrovaný konjugát (100x) | 1 x 0,3 ml |
| 4b | Ředicí pufr č. 1 | 1 x 120 ml |
| 5 | Ředicí pufr č. 2 | 1 x 120 ml |
| A | TMB substrát č.13 | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 60 ml |
| C | Mycí koncentrát (20X) | 1 x 100 ml |
| Další součásti: sáček se zipovým uzávěrem | 1 |

Poznámka: Popis symbolů použitých v této příbalové informaci a popisků této testovací sady najdete v tabulce na konci informace.

**Uchovávání**

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

**Potřebné materiály, které nejsou součástí sady**

* Přesné pipety nebo multikanálové pipety
* Jednorázové pipetovací špičky
* Odměrný válec se stupnicí na mycí roztok
* Čtečka mikrodestiček s 96 jamkami (vybavená filtrem s vlnovou délkou 450 nm)
* Mycí zařízení na mikrodestičku (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu činidel používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka
* Materiál na zakrytí destiček (víčka, aluminiová nebo přilnavá fólie)
* Třepačka na mikrodestičky

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními.
* Při manipulaci se vzorky a činidly používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle nebo obličejový štít.
* Další informace najdete v bezpečnostních listech materiálu.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití činidel naleznete na konci této příbalové informace.

**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.
* 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 (20X) musí být před použitím zředěn destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:20 (např. 15 ml mycího koncentrátu (20X) a 285 ml destilované vody). Tento roztok je dále nazýván „mycí roztok“.

**Poznámka:** Mycí koncentrát (20 x) zahřejte na 18–26°C a důkladně promíchejte, aby se rozpustily sražené soli. Pokud se uchovává při teplotě 2–8°C, zůstává roztok stabilní až po dobu 3 dní.

**Konjugát**

Konjugovaný koncentrát musí být zředěn 1:100 v ředícím pufru č.1.

**Poznámka:** Naředěný roztok konjugátu je stabilní až 8 hodin při 18-26°C.

**Postup testu**

Všechny činidla použité 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 pouze 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 dejte 190 μl ředicího pufru č. 2.

3. Do dvou -Ag jamek (sloupec s lichými čísly) a dvou +Ag jamek (sloupec se sudými čísly) dejte 10 μl NEŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK).

4. Do dvou -Ag jamek (sloupec s lichými čísly) a dvou +Ag jamek (sloupec se sudými čísly) dejte 10 μl NEŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK).

5. Do zbývajících jamek dejte 10 μl NEŘEDĚNÉHO testovaného vzorku: do jedné -Ag jamky (sloupec s lichými čísly) a jedné +Ag jamky (sloupec se sudými čísly).

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

7. Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 1 hodiny (±5 min.) při 18-26°C (±3°C).

8. Odstraňte roztok a každou jamku 3x 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.

9. Do každé jamky dejte 100 μl ZŘEDĚNÉHO konjugátu.

10. Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 30 minut (±3 min.) při 18–26°C.

11. Opakujte krok č. 8.

12. Do každé jamky přidejte 100 μl TMB substrátu č. 13.

13. Inkubujte po dobu 20 minut (±3 min.) při 18–26°C mimo přímé světlo.

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

15. Změřte a zaznamenejte hodnotu optické hustoty vzorků a kontrolních vzorků při 450 nm.

Poznámka: Při využití robotiky umožňuje inkubace v inkubační komůrce pracovat bez zakrývání destiček. Použití robotiky není kompatibilní s jemným poklepáváním nebo otíráním destiček. Destičky lze před hodnocením uchovávat až 1 hodinu ve tmě.

**16.** **Výpočty:**

**Kontrolní vzorky**

|  |
| --- |
| PKx = PK1+Ag A(450) + PK2+Ag A(450)2 |
| NExNK = (NK1+Ag A(450) - NK1-Ag A(450)) + (NK2+Ag A(450) - NK2-Ag A(450))2 |
| NExPK = (PK1+Ag A(450) - PK1-Ag A(450)) + (PK2+Ag A(450) - PK2-Ag A(450))2 |

Vypočítejte průměr pozitivní kontroly (PKx), průměrnou celkovou extinkci pozitivní kontroly (NExPK) a průměrnou celkovou extinkci negativní kontroly (NExNK).

**Kritéria validity**

PKx ≥ 0,350 NExPK/NExNK ≥ 3,50

**Poznámka:** Je-li hodnota extinkce negativní kontroly (NExNK) méně než 0, použijte její absolutní hodnotu. Je-li rovna nule, použijte standardně hodnotu NENK = 0,001.
Při neplatnosti výsledků je třeba předpokládat chybu v technice provedení. Doporučuje se důkladně znovu prostudovat příbalovou informaci a test provést znovu.

**Vzorky**

NE = S+Ag A(450) - S-Ag A(450)

S/P % = 100 x (NE/NExPK)

c S/P % = 0,8 x S/P %

Vypočítejte hodnotu NE pro každý vzorek odečtením odpovídající hodnoty optické hustoty (OD450) získané z kontrolní jamky (S-Ag A450) od hodnoty OD450 získané z potahované jamky (S+Ag A450).

**Interpretace**Negativní: c S/P % < 20

Pozitivní: c S/P % ≥ 20

• procento S/P větší nebo rovno 20% a menší než 40%: Pozitivní 1 křížek (+)

• procento S/P větší nebo rovno 40% a menší než 60%: Pozitivní 2 křížky (++)

• procento S/P větší nebo rovno 60% a menší než 80%: Pozitivní 3 křížky (+++)

• procento S/P větší nebo rovno 80% a menší než 100%: Pozitivní 4 křížky (++++)

• procento S/P větší nebo rovno 100%: Pozitivní 5 křížků (+++++)

Demonstrace sérokonverze u dvou vzorků odebraných v intervalu 2-3 týdnů umožňuje definitivní diagnózu. Rozdíl dvou křížků v signálu dvou vzorků nasvědčuje, že k sérokonverzi došlo.

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

**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](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. (Veškerá práva vyhrazena.

**VAROVÁNÍ**


**Pozitivní kontrola/Negativní kontrola** – Může vyvolat alergickou kožní reakci. Používejte ochranné rukavice. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody s mýdlem. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**Koncentrovaný konjugát / Ředicí pufr č. 2** – Může vyvolat alergickou kožní reakci. Škodlivý pro vodní organizmy, s dlouhodobými účinky. Používejte ochranné rukavice. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody s mýdlem. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.



**Zastavovací roztok** - Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné poškození očí. Škodlivý pro vodní organizmy, s dlouhodobými účinky. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení. PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou. PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

**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

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive

Westbrook, Maine 04092

USA

*Výrobce*

IDEXX Montpellier SAS

326 rue de la Galéra

34090 Montpellier

Francie

*Zástupce pro EU*

IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofddorp

Nizozemsko

idexx.com