**Testovací souprava k prokázání rotavirů, coronavirů a *E.coli***

Pouze k veterinárnímu užití

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX Rota-Corona-K99 je enzymatický imunotest od firmy IDEXX pro detekci antigenů rotavirů, coronavirů a *E.coli* ve výkalech telat.

**Obecné informace**

Průjem je významnou příčinou smrti u telat mladších jednoho měsíce. U skotu často způsobuje neonatální gastroenteritidu více faktorů. Může jít o následek virové infekce (Coronavirus a Rotavirus), bakteriální infekce (převážně enterotoxigenní colibacillus – *Salmonella*) nebo protozoální infekce *(Cryptosporidium parvum)*. Jelikož není možné stanovit původce na základě klinických příznaků, musí být příčina průjmu povinně stanovena laboratorními testy. Test předkládaný v této sadě umožňuje diferenciální diagnostiku tří původců: rotavirů, coronavirů a *E. coli* (prostřednictvím detekce připojovacího faktoru K99) pomocí detekce jejich antigenů metodou ELISA. Tato metoda je uživatelsky snadná, rychlá, spolehlivá a velmi vhodná pro analýzu velkého množství vzorků. Hlavním atributem tohoto testu je možnost jeho uzpůsobení podle vlastních potřeb: využití 1, 2 nebo 3 valencí, zvlášť nebo společně (společné nanesení všech tří protilátek do jamek a tři specifické konjugáty s různými barvami).

**Popis a principy**

Na mikrotitračních destičkách je nanesena směs tří protilátek: polyklonální protilátky anti-rotavirus, polyklonální protilátky anti-coronavirus a monoklonální protilátky anti-K99 *(E.coli).* Testované vzorky se zředí a inkubují v jamkách destičky. Během inkubace vzorku v potažených jamkách vytvoří rotavirové antigeny, coronavirové antigeny a K99 *(E.coli)* antigeny, jsou-li ve vzorku přítomny, imunokomplexy s protilátkami nanesenými na mikrodestičce. Po vymytí nenavázaného materiálu se přidá anti-rotavirus, anti-coronavirus nebo anti-K99 enzymový konjugát, který se naváže na jakýkoli vzniklý imunokomplex. 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 vývoj zabarvení přímo souvisí s množstvím antigenu přítomného v testovaném vzorku. Výsledek se získá porovnáním optické hustoty vzorku s průměrnou optickou hustotou pozitivní kontroly.

**Činidla** **Objem**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená anti-rotavirus-coronavirus-K99 Ab | 1 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek | 1 x 1,0 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 1,0 ml |
| 4a | Konjugát anti-rotavirus | 1 x 15 ml |
| 4c | Konjugát anti-coronavirus | 1 x 15 ml |
| 4d | Konjugát anti-K99 (E.coli) | 1 x 15 ml |
| 5 | Ředicí pufr č. 8 | 1 x 50 ml |
| A | TMB substrát č. 9 | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 60 ml |
| C | Mycí koncentrát (20x) | 1 x 100 ml |

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
* 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
* Odměrný válec se stupnicí na mycí roztok
* Materiál na zakrytí destiček (víčka, aluminiová nebo přilnavá fólie)
* Centrifuga (zrychlení 2000 x g)
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka
* 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 a nezaměňujte součásti ze souprav s různými sériovými čísly.

**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.

**Příprava vzorků**

U neonatálního průjmu telat jsou výkaly tekuté, vodnou fázi lze tedy po sedimentaci snadno nabrat pipetou (nádobu s výkaly nechte několik minut odstát).

Nejsou-li výkaly tekuté, lze vzorek v případě potřeby zředit (v poměru 1:2 až 1:10) ředicím pufrem č. 8; zředěný vzorek protřepejte a po sedimentaci nasajte vodnou fázi. Pokud přiložený objem ředicího pufru č. 8 nestačí, lze použít i jiné vodné roztoky, jako je například PBS o pH 7,2 – 7,4 nebo fyziologický roztok (H2O + 0,8% NaCl). Toto ředění nemá na finální výsledek žádný vliv.

Odstředění není nezbytné, ale pokud výkaly obsahují mnoho hlenu nebo husté viskózní tkáně, lze je odstřeďovat při 500-1000 x g po dobu 5-10 minut. Odstředění nemá vliv na finální výsledek.

**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.

2. Do každé jamky dejte 50 μl ředicího pufru č. 8.

3. Do určených jamek rozdělte negativní kontrolní vzorky (NK):

* 50 μl do jedné jamky, pokud testujete přítomnost jednoho patogenu.
* 50 μl do dvou jamek, pokud testujete přítomnost dvou patogenů.
* 50 μl do tří jamek, pokud testujete přítomnost tří patogenů.

4. Do určených jamek rozdělte pozitivní kontrolní vzorky (PK)

* 50 μl do dvou jamek, pokud testujete přítomnost jednoho patogenu.
* 50 μl do čtyř jamek, pokud testujete přítomnost dvou patogenů.
* 50 μl do šesti jamek, pokud testujete přítomnost tří patogenů.

5. Do zbývajících jamek dejte 50 μl testovaného vzorku.

6. Homogenizujte obsah mikrojamek pomocí třepačky.

7. Zakryjte mikrodestičku a inkubujte po dobu 30 minut (±3 min.) při 18-26°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 určených jamek rozdělte příslušný konjugát:

* 100 μl anti-rotavirus konjugátu do jamek určených pro detekci rotavirů.
* 100 μl anti-coronavirus konjugátu do jamek určených pro detekci coronavirů.
* 100 μl anti-K99 *(E.coli)* konjugátu do jamek určených pro detekci *E. coli.*

10. Zakryjte destičku a inkubujte na třepačce 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. 9.

13. Inkubujte po dobu 10 minut (±3 min.) při teplotě 18–26°C a mimo přímé světlo.  
**Poznámka:** Pokud jste zvolili možnost hodnocení prostým okem, **NEPŘIDÁVEJTE ZASTAVOVACÍ ROZTOK** a pokračujte přímo na výpočty/kritéria validity testu, část „Hodnocení prostým okem“.

14. **POUZE POKUD VYUŽÍVÁTE HODNOCENÍ SPEKTROFOTOMETREM:** do každé jamky přidejte 100 μl zastavovacího roztoku č. 3.

15. Změřte a zaznamenejte optickou hustotu 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 A(450) + PK2 A(450)  
 2

**Kritéria validity při použití spektrofotometru**

PKx ≥ 0,500 PKx: NK A(450) ≥ 5,00

**Kritéria validity při hodnocení prostým okem**

Aby byl test validní, pozitivní kontrolní vzorek musí vyvinout dobře patrné modré zabarvení. Negativní kontrolní vzorek musí zároveň být bez zabarvení, nebo se světle modrým zabarvením.

Při neplatnosti výsledků je třeba předpokládat chybu v technice provedení. Doporučuje se důkladně znovu prostudovat přiložený leták a test provést znovu. **Poznámka:** Společnost IDEXX má přístrojové a softwarové systémy, které vypočítávají výsledky a poskytují souhrny údajů.

**Vzorky**

S/P % = 100 X Vzorek A(450) vzorku – NK A(450)  
 PKx - NK

**17. Interpretace:**

**Výsledky s využitím spektrofotometru:**

Negativní: S/P % < 7 %  
Pozitivní: S/P % ≥ 7 %

**Výsledky hodnocení prostým okem:**

Negativní: Vzorky s modrým zbarvením světlejším nebo podobným zbarvení v příslušné jamce negativní kontroly.

Pozitivní: Vzorky s modrým zbarvením tmavším, než je zbarvení v příslušné jamce negativní kontroly.

**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.

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

**s**

**VAROVÁNÍ**

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

**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 / 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**

 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