**EIAV AGID ANTIBODY TEST KIT**

**PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ. Veterinární přípravek.**

**NÁVOD K POUŽITÍ – SOUPRAVA PRO TESTOVÁNÍ PROTILÁTEK PROTI VIRU EIA**

**Obecný popis**

Tento imunodifúzní test pro detekci viru infekční anémie koní (EIAV) detekuje v sérech koňovitých precipitující protilátky proti purifikovanému rekombinantnímu jádrovému proteinu viru EIA o molekulové hmotnosti 26 000 (p26). Vzorky sér, pokud jsou pozitivní, vytvoří linii, která reaguje s referenčními pozitivními kontrolními liniemi, nebo která vychýlí referenční pozitivní kontrolní linie směrem dovnitř v blízkosti jamky se vzorkem. Negativní séra nevytvoří linii, která by reagovala s referenční pozitivní kontrolní linií ani nezpůsobí její odchylku.

**Obsah** **soupravy**

1x lahvička A: ……… EIAV p26 Antigen ……………………….. 3,35 ml

1x lahvička R: ……… Referenční pozitivní kontrolní sérum ….. 10 ml

**Tato činidla postačují k provedení až 200 testů.**

**Potřebné materiály, které nejsou součástí balení**

Topná deska, autokláv nebo mikrovlnná trouba, váhy, baňka o objemu 250 ml, laboratorní pipety, chladnička, standardní řezačka gelu, vakuová pumpa nebo vodou poháněná filtrační pumpa, mikropipetor, jednorázové pipetovací hroty, plastová nádoba, vysoce intenzivní světelný zdroj s úzkým paprskem, vodní lázeň o teplotě 45 °C (doporučovaná, ale ne nutná), přečištěný agar, hydroxid sodný, kyselina boritá, destilovaná nebo deionizovaná voda, plastové Petriho misky o průměru 100 mm nebo plastový tácek o rozměrech 45 x 90 mm.

**Skladování a stabilita**

Nepoužívejte součásti jiných balení. Všechna činidla skladujte při teplotě 2–8 °C. Nezamrazujte. Reakční činidla zůstávají stabilní až do data exspirace, pokud jsou skladována podle pokynů. Testovací soupravu nepoužívejte po uplynutí exspirace uvedené na krabičce. Používejte čisté vybavení, aby nedošlo ke kontaminaci činidel.

**Příprava agarového gelu**

1. Připravte boritanový pufr smícháním 2 g hydroxidu sodného a 9 g kyseliny borité v 1 litru destilované vody. Výsledné pH by mělo být přibližně 8,6.
2. V boritanovém pufru připravte 1% roztok ušlechtilého agaru.
3. Roztok vařte, dokud se nerozpustí, a poté jej 7 minut autoklávujte při tlaku 20 PSI a teplotě 121 °C. Roztok agaru a pufru také ohřívejte v mikrovlnné troubě v 30 sekundových intervalech po dobu přibližně 3 minuty nebo do úplného rozpuštění agaru.
4. Roztok ochlaďte na 45 °C a poté přeneste 15 ml roztoku do Petriho misky o průměru 100 mm nebo 11 ml do misek o rozměrech 45 x 90 mm. Agar by měl mít tloušťku 2,8 mm.
5. Agar nechte vychladnout v bezprašném prostředí. Během chlazení odstraňte víčka, aby mohla unikat vodní pára. Pro dosažení nejlepších výsledků doporučujeme destičky s čerstvě nalitým roztokem před použitím skladovat přes noc při teplotě 2–8 °C. Destičky nebo tácky s nerozřezaným agarem lze skladovat převrácené při teplotě 2-8 °C v sáčcích na zip až po dobu jednoho týdne. Před použitím zkontrolujte uskladněný agar, zda není vysušený nebo pokrytý kondenzující vlhkostí.

**Vyřezávání jamek v agarovém gelu**

Používá se vzor se sedmi jamkami – s jednou středovou jamkou a šesti jamkami v kruhu kolem ní. Jamky jsou od sebe vzdáleny 2,4 mm a mají průměr 5,3 mm. Agar se řeže po dostatečném ztuhnutí, aby se při odstraňování agarových zátek neporušily řezné hrany jamek. Agarová zátka se z jamek odsaje pomocí kovové nebo skleněné kanyly, která je vytažena do malého otvoru (o průměru 1–2 mm) a připojena k vakuovému potrubí. Dbejte na to, aby nedošlo k oddělení agaru od destičky. Pokud se před zavedením činidel nebo vzorků objeví v jamkách vlhkost, je třeba ji odsát nebo nechat odpařit. Destičky by měly být použity v den jejich rozřezání.

**Požadavky na vzorky**

Testovaný vzorek musí být sérum. Vzorek séra by měl být co nejdříve oddělen od sraženiny a uchováván při teplotě 2–8 °C, nebo zmrazen až do provedení testu. Sérum však může být uchováváno při teplotě 2–8 °C, a to buď na sraženině nebo bez ní, až do doby provedení testu po dobu 28 dnů. Oddělené sérum lze zmrazit na dobu neurčitou až do provedení testu. Hemolyzované sérum může zabarvit agar, ale nebylo prokázáno, že by ovlivnilo výsledek testu. Nicméně testování silně hemolyzovaných nebo kontaminovaných vzorků se nedoporučuje.

**Plnění jamek a inkubace agarových destiček**

Antigen (A) se dávkuje do prostřední jamky mikropipetou v objemu 50 µl. Dále se dávkuje 50 µl referenčního pozitivního kontrolního séra (R) do jamek na každé straně testovaného vzorku (vzorků) (obrázek 1). Toto uspořádání poskytuje pozitivní kontrolní linii na každé straně testovaného séra, což usnadňuje přesné určení linie identity. V každém běhu lze testovat celkem tři vzorky v objemu 50 µl pro každou jamku. Jamky se naplní do úrovně povrchu agaru, aniž by vznikl prohnutý meniskus. Sérum nesmí stékat po vrchní části agaru. Před přemístěním nechte destičky několik minut odstát, abyste minimalizovali riziko rozlití. Destičky se inkubují při pokojové teplotě (23 ± 2 °C) v uzavřené vlhké komoře. Bude-li pokojová teplota vyšší než 25 °C nebo nižší než 20 °C, měl by být použit inkubátor s teplotou 22 °C.

**Kontrola testu**

Aby byl test platný, musí být referenční linie (mezi jamkami s pozitivním referenčním sérem a centrální jamkou s antigenem EIAV) snadno viditelné. Tyto linie by měly být jasně viditelné až k okraji jamek pro negativní vzorky. V opačném případě nelze analýzu přesně vyhodnotit.

**Hodnocení výsledků**

K osvětlení při zjišťování hodnot by měl být použit intenzivní úzký paprsek světla nastavitelný pro různé polohy. Reakci je třeba pozorovat na černém pozadí. V některých případech je užitečná lupa. Čítače vyrobené pro pozorování obarvených imunodifúzní reakcí nejsou pro odečet hodnot z tohoto testu vhodné. Pro úplnou imunodifúzní reakci je zapotřebí minimálně 24 hodin. Bude-li reakce dokončena po 24 hodinách inkubace, lze oznámit výsledek. Reakce je dokončena, když linie pozitivní kontroly přejdou do jamky obsahující negativní vzorek nebo když se mezi vzorkem a pozitivním kontrolním sérem vytvoří zřetelná specifická linie identity. Některé slabě pozitivní vzorky potřebují k dokončení reakce 48 hodin. Ty by měly být před oznámením výsledků znovu otestovány. Typ reakce se liší podle koncentrace protilátky v testovaném vzorku. Referenční pozitivní kontrolní sérum je základem pro zjištění hodnot z testu. Pokud se nejedná o zřetelnou linii, je test neplatný a musí se opakovat.

**Při testu je možné získat následující typy reakcí:**

1. **Negativní**: Linie referenční pozitivní kontroly pokračují do jamky pro testovaný vzorek bez ohybu nebo s mírným ohybem směrem od jamky pro antigen (A) k pozitivnímu kontrolnímu séru (obrázek 2, S1, negativní vzorek).
2. **Pozitivní**: Kontrolní linie se spojí s linií mezi testovaným sérem (S2) a antigenem (A) a vytvoří s ní souvislou linii (obrázek 2).
3. **Hraniční:** Linie referenční pozitivní kontroly se mírně ohýbají směrem k jamce s antigenem (A) a od jamek s referenčním pozitivním kontrolním sérem (R), ale netvoří úplnou linii mezi antigenem (A) a testovacím sérem (S3) (obrázek 2). Tyto reakce vyžadují pečlivé pozorování a lze je snadno přehlédnout. Všechny slabě pozitivní vzorky by měly být před oznámením výsledků znovu testovány.

Slabé imunodifúzní reakce byly pozorovány ve třech typech případů:

a) Hříbě kojené infikovanou klisnou má v důsledku kolostrálních protilátek slabé až poměrně silné reakce, jež mohou přetrvávat až do 5 měsíců věku. Pokud jsou klisna i hříbě pozitivní, mělo by být hříbě ve věku 6 měsíců znovu testováno, aby se zjistilo, zda je negativní. Jestliže je klisna negativní, její pozitivní hříbě by mělo být považováno za nakažené.

b) Během inkubační doby EIA byly pozorovány slabě pozitivní výsledky. Pokud se druhý vzorek odebere o dva až tři týdny později, měla by být reakce silnější.

c) U nepůvodních přenašečů, u nichž se po dlouhou dobu nevyskytují žádné klinické příznaky EIA, může být reakce v testu slabá. V těchto případech vede opakovaná zkouška jen zřídka ke změně v intenzitě reakce.

**4) Velmi silně pozitivní**: Linie referenční pozitivní kontroly se stáčejí směrem k jamce s antigenem dříve, než dosáhnou jamky obsahující testovací sérum (S1), a mezi testovacím sérem (S1) a antigenem (A) je široká, nejasná linie (obrázek 3). Tato linie se nachází velmi blízko jamky s antigenem (A), zejména pokud je destička pozorována po 24 hodinách.

**5) Nespecifické linie**: Tyto linie jsou pozorovány mezi jamkou s antigenem a testovacím sérem. Referenční pozitivní kontrolní linie však projdou nespecifickou linií a pokračují do jamky testovacího séra negativních sér (není zobrazeno). Nespecifická linie netvoří souvislou linii s referenčními pozitivními kontrolními liniemi.

Referenční pozitivní kontrolní linie budou tvořit ostřejší úhly s nespecifickou linií než s linií identity specifickou pro EIAV. Nespecifické linie jsou tvořeny reakcí vzorku s protilátkou s jinými antigeny než EIAV p26. Vzorek séra může produkovat specifickou linii EIAV i nespecifickou linii (obrázek 3, S2). Je třeba dbát na to, aby specifická reakce nebyla zastřena linií, jež netvoří součást EIAV. Opakované testování takových vzorků a pozorování reakcí v častých intervalech může usnadnit určení, zda jsou vzorky pozitivní nebo negativní.

**6) Závoj kolem jamky**: V některých případech se kolem jamky pro testovací sérum vytvoří závoj způsobený lipidy nebo jinými složkami krevního séra, který může zakrýt linie referenční pozitivní kontroly v blízkosti jamky vzorku (obrázek 3, S3). Pokud se test odečítá po 24 a 48 hodinách, lze někdy výsledky určit dříve, než reakci zakryje závoj. V některých případech však nelze stanovení provést a je třeba požádat o další vzorek.

Všechny pozitivní výsledky by měly být před nahlášením výsledků potvrzeny opakovaným testováním. Vzorky, u nichž se objeví hraniční reakce, by měly být před nahlášením výsledků znovu dvakrát testovány.

Obrázek 3

Obrázek 2

Obrázek 1



Obecně se má za to, že koně infikovaní EIAV jsou nositeli viru po celý život. Infikovaní koně nemusí vykazovat klinické příznaky po několik měsíců nebo let, ale stále mají v krvi infekční virus EIA. Proto by měl být každý dospělý kůň, který má pozitivní výsledek EIA testu, považován za nakaženého.

**Poznámka pro zákazníky v USA:**

Prodej a použití v USA je omezeno na laboratoře schválené státními a federálními veterinárními úředníky (USDA). Národní laboratoře veterinárních služeb budou pravidelně dodávat vzorky kódovaných kontrolních testů k vyhodnocení způsobilosti laboratoří schválených USDA. Jakýkoli sporný vzorek by měl být zaslán k ověření do laboratoří Národní veterinární služby.

**Bezpečnostní opatření**

Se složkami soupravy je třeba zacházet jako s potenciálně nebezpečnými a také je tak likvidovat. Nejezte, nepijte a nekuřte v místech, kde se manipuluje se vzorky séra a reakčními činidly soupravy. Nepipetujte ústy. Po polknutí vyhledejte lékaře. Nepoužívejte prošlá nebo kontaminovaná činidla ani činidla z jiných souprav nebo sérií. Nekombinujte činidla z různých šarží téhož přípravku. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů.

Složka A – antigen EIAV p26 – obsahuje jako konzervační látku azid sodný.

Složka R – referenční pozitivní kontrolní sérum – obsahuje jako konzervační látku azid sodný.