**Testovací souprava na průkaz antigenů viru klasického moru prasat (CSFV) – sérum plus**

**Pouze k veterinárnímu užití.**

**Název a zamýšlené užití**

**Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kits (CSFV) Serum Plus** je enzymatický imunologický test pro detekci antigenů CSFV ve vzorcích séra, plazmy a tkání (nejlépe mandlí, sleziny, mezenterických lymfatických uzlin nebo ledvin) prasat.

**Obecné informace**

Virus klasického moru prasat (CSFV), bovinní virové diarey (BVDV) a hraniční choroby (BDV) společně patří do rodu *Pestivirus* z čeledi Flaviviridae. CSFV jakožto obligátní patogen zapříčiňující masová úmrtí způsobuje závažné ztráty v chovu prasat. Prasata infikovaná vysoce virulentními kmeny CSFV mohou před objevením klinických příznaků onemocnění vylučovat velká množství viru. Zvířata, která přežijí akutní nebo subakutní infekci si vyvinou protilátky a virus již dále nešíří. Středně virulentní, méně patogenní kmeny mohou způsobit chronickou infekci, při níž prasata vylučují virus kontinuálně nebo přerušovaně až do smrti. Plody vnímavých březích prasnic vystavených CSFV mohou být infikovány skrze placentu. Kongenitální infekce může vyústit v potrat, mumifikaci plodu, narození mrtvých nebo slabých selat nebo malformace embryí. Nejčastějším výsledkem kongenitální infekce nízkovirulentními kmeny je narození perzistentně infikovaných selat, která bez imunitní odpovědi šíří virus, aniž by se u nich projevovaly příznaky onemocnění. Prasata mohou být infikována rovněž BVDV nebo BDV. Ačkoli jsou tyto infekce u prasat obvykle mírné a sebeomezující, detekce viru je v takových případech velmi vzácná. Vzhledem k vysoké senzitivitě testu Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kits (CSFV) Serum Plus vůči všem pestivirům nelze detekci BVDV nebo BDV vyloučit. Pozitivní výsledky se proto doporučuje potvrdit provedením testu specifického pro CSFV.

**Popis a principy**

Mikrotitrační formát testu byl vytvořen imobilizací specifických monoklonálních protilátek na mikrotitračních destičkách. CSFV Ag ze vzorků se pak na destičkách zachytí. Po inkubaci testovaného vzorku v jamkách destiček je zachycený CSFV Ag detekován konjugátem specifického polyklonálního antiséra CSFV (Erns) a křenové peroxidázy. V dalším kroku se nenavázaný konjugát vymyje a přidá se roztok substrátu/chromogenu. V přítomnosti enzymu je substrát konvertován na produkt, který reaguje s chromogenem za vzniku modrého zbarvení. Po přidání zastavovacího roztoku vzniká žluté zabarvení. Absorbance při jedné vlnové délce 450 nm [A(450)] nebo duální vlnové délce 450 a 650 nm [A(450/650)] se měří pomocí spektrofotometru. Hodnota korigované optické hustoty vzorků se vypočítá pomocí absorbance [A(450)] nebo [A(450/650)] testovaného vzorku po korekci na absorbanci negativní kontroly.

Reagencie Objem

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená Anti-Erns mAb | 2 | 5 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml |
| 4 | Konjugát | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml |
| 5 | Koncentrát pufrační roztoku pro namáčení vzorků tkáně (2X) | 1 x 115 ml | 2 x 115 ml |
| A | TMB substrát č. 12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml |
| C | Koncentrát mycího roztoku (10 X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml |
| D | Detekční roztok | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml |
| Další komponenty: sáček se zipovým uzávěrem | 1 | - |

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

**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 nebo duálními filtry o vlnové délce 450 a 650 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 zařízení
* Kryty na mikrodestičky (víčka, hliníková nebo přilnavá fólie) a/nebo vlhká komora
* Centrifuga (přetížení 1500x g)
* 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 reagencii 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 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.
* 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 (10x) je nutno zahřát na teplotu 18–26°C a dobře promíchat, aby se rozpustily veškeré sražené soli. Koncentrát mycího roztoku (10X) musí být před užitím zředěn destilovanou/deionizovanou v poměru 1:10 (např. 30 ml koncentrátu na 270 ml vody pro každou testovanou destičku).

Mycí roztok připravený za sterilních podmínek lze při teplotě 2–8°C uchovávat po dobu jednoho týdne.

**Pufrační roztok pro namáčení vzorků tkáně**

Koncentrát pufračního roztoku (2X) je nutno zahřát na teplotu 18–26°C a dobře promíchat, aby se rozpustily veškeré sražené soli. Koncentrát pufračního roztoku pro namáčení vzorků tkáně před použitím zřeďte destilovanou/deionizovanou vodou v poměru 1:2. Objem zředěného pufračního roztoku je nutno vypočítat dle potřeby.

Pufrační roztok pro namáčení vzorků tkáně připravený za sterilních podmínek lze při teplotě 2–8°C uchovávat až po dobu dvou týdnů.

**Příprava vzorků**

**Vzorky plazmy a séra**

Testovat lze čerstvé nebo zmražené vzorky séra a plazmy.

**Tkáně**

Pokud možno, používejte čerstvé vzorky tkání. V případě potřeby však lze vzorky tkání uchovávat zmražené. Z každého testovaného zvířete zpracujte jeden až dva vzorky tkání, nejlépe mandlí, sleziny, mezenterických lymfatických uzlin nebo ledvin.
a. Tkáň nastřihejte nůžkami na malé kousky (250 mg).
b. Vložte vzorky tkáně do vhodné centrifugační zkumavky nebo Eppendorfovy zkumavky a přidejte 1 ml pufračního roztoku pro namáčení tkání. Protřepejte na vortexu. Ponechte namáčet po dobu 1-2 hodin při teplotě 18–26°C.
c. Centrifugujte při přetížení 1500x g po dobu 10 minut. Jako testovací vzorek (popsáno níže v postupu testu) použijte 50 μL takto získaného čistého supernatantu.

**Pro vzorky tkáně se doporučuje použít protokol s inkubací vzorků přes noc (12–18 hodin při teplotě 2–8°C).**

**Postup testu**

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

1. Připravte si potažené destičky a zaznamenejte umístění vzorku. Používáte-li pouze část destičky, oddělte počet 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 50 μl detekčního roztoku.

3. Do duplicitních jamek dejte 50 μl negativního kontrolního vzorku (NK).

4. Do duplicitních jamek dejte 50 μl pozitivního kontrolního vzorku (PK).

5. Do zbývajících jamek dejte 50 μl testovaného vzorku.

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

7. Inkubujte vzorky:
a. Vzorky séra a plazmy: 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 komoře, aby se zabránilo vypařování.

b. Vzorky tkání: inkubujte přes noc (12 - 18 hodin) při 2–8°C. Destičky by měly být těsně uzavřeny nebo inkubovány ve vlhké komoře, aby se zabránilo vypařování.

8. Odstraňte roztok a každou jamku 5x vymyjte asi 300 μl mycího roztoku. Mezi vymýváním a před přidáním další reagencie nenechte destičku vyschnout. Pro odstranění zbylého mycího roztoku po posledním vymytí destičkou poklepejte na savý materiál.

9. Do každé jamky dejte 100 μl konjugátu.

10. Inkubujte po dobu 30 minut (±3 min.) při teplotě 18–26°C.

11. Opakujte krok č. 8.

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

13. Inkubujte po dobu 10 minut (±1 min.) při teplotě 18–26°C mimo dosah přímého světla.

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:

**Kontroly**

NKx = NK1 A(450) + NK2 A(450) PKx = PK1 A(450) + PK2 A(450)
 2 2

**Kritéria validity:**

PKx – NKx ≥ 0,150 NKx ≤ 0,250

Při neplatnosti výsledků je třeba předpokládat chybu v technice provedení. Doporučuje se důkladně znovu prostudovat přiloženou příbalovou informaci a test provést znovu.

**Vzorky:**

S–N = A(450) vzorku – NKx

Přítomnost nebo nepřítomnost antigenu CSFV ve vzorku je určena korigovanou hodnotou OD (S-N) jednotlivých vzorků.

17. Interpretace:

Negativní: S–N ≤ 0,300

Pozitivní: S–N > 0,300

**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.

©2018 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**Upozornění**

**EUH208**

**Pozitivní kontrola/Koncentrát mycího roztoku –** Obsahuje Kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

**H316 / P332+P313 / EUH208**

**Konjugát –** Způsobuje mírné podráždění pokožky. Pokud dojde k podráždění pokožky: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Obsahuje Kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

**H319 / P280 / P337+P313 / EUH208**

**Pufrační roztok pro namáčení vzorků tkáně –** Způsobuje závažné podráždění očí. Používejte ochranné brýle. Pokud podráždění očí přetrvává: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Obsahuje Kathon. Může vyvolat alergickou reakci.

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

**TMB substrát** **–** Způsobuje podráždění pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**H302 / H315 / H317 / H319 / H335 / P280 / P333+P312 / P337+P313 / P362+P364 / P501**

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

Dojde-li k podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

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

Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte. Obsah zneškodněte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

**H316 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313 / EUH208**

**Detekční protilátky –** Způsobuje mírné podráždění pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice/ochranné 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.

**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 Switzerland AG

Stationsstrasse 12

CH-3097 Liebefeld-Bern

Švýcarsko

Zástupce pro EU a držitel rozhodnutí o schválení

IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofddorp

Nizozemsko