**Testovací souprava k prokázání protilátek proti viru enzootické bovinní leukózy (BLV)**

Pouze k veterinárnímu užití

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX Leukosis Serum Screening (sérový screening) je enzymatický imunotest pro detekci protilátek proti viru enzootické bovinní leukózy (BLV) ve vzorcích séra a plazmy od jednotlivých kusů skotu nebo v hromadných vzorcích (pools) od max. 10 kusů společně.

**Obecné informace**

Enzootická bovinní leukóza (BLV) je infekční lymfoproliferativní onemocnění skotu, které se vyskytuje na celém světě. Onemocnění je způsobováno exogenním deltaretrovirem - virem enzootické bovinní leukózy (BLV), který vytváří perzistentní infekci v subpopulaci B-lymfocytů prostřednictvím integrace provirové DNA do řady míst buněčné DNA. Většina infikovaného skotu zůstává během života zdráva, asi u 30 % se však vyvine perzistentní lymfocytóza a u malé části
(do 10 %) lymfoidní nádory. Onemocnění zasahuje především stáda dojnic a šíří se převážně horizontálním přenosem při kontaktu s krví nebo sekrety, obsahujícími infikované lymfocyty.
Jelikož není k dispozici žádná léčba ani vakcína, spočívají eradikační programy především v identifikaci a eliminaci infikovaných zvířat, prováděné převážně pomocí detekce antivirálních protilátek. Infikovaný skot vytváří specifické protilátky proti hlavním virovým proteinům již od rané fáze infekce. Dříve se k detekci protilátek proti povrchovým virovým glykoproteinům využíval agarový imunodifuzní test (AGID). Jeho senzitivita je však omezena a byly nahlášeny případy, kdy u infikovaných zvířat nevznikla zachytitelná protilátková odpověď. Z tohoto důvodu je nyní pro dohled nad stády využívána metoda ELISA, která je jednoduchá, rychlá a citlivá.

**Popis a principy**

Mikrotitrační destičky jsou potaženy BLV antigenem. Vzorky určené k testování se zředí a inkubují v jamkách destičky. Při inkubaci testovaného vzorku v potažených jamkách vytvoří BLV specifické protilátky imunokomplex s BLV antigenem. Po vymytí nenavázaného materiálu se přidá anti-bovinní enzymový konjugát, který se naváže na imunokomplexy antigen-protilátka.

Nenavázaný konjugát se vymyje a přidá se enzymový substrát (TMB). V přítomnosti enzymu je substrát oxidován a vyvíjí se modrá sloučenina, která po blokování zežloutne. Následný rozvoj zbarvení přímo souvisí s obsahem protilátek proti BLV v testovaném vzorku. Výsledek se získá srovnáním optické hustoty vzorku s průměrnou optickou hustotou pozitivní kontroly.

Činidla Objem

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená antigenem BLV | 5 | 10 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek  | 1 x 1,0 ml | 1 x 1,0 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 1,0 ml | 1 x 1,0 ml |
| 4a | Koncentrovaný konjugát (100X) | 1 x 1,5 ml | 1 x 1,5 ml |
| 4b | Ředicí pufr č. 1 | 1 x 120 ml | 1 x 120 ml |
| 5 | Ředicí pufr č. 2 | 1 x 120 ml | 2 x 120 ml |
| A | TMB substrát č. 13 | 1 x 60 ml | 1 x 120 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 60 ml | 1 x 120 ml |
| C | Mycí koncentrát (10X) č. 2  | 2 x 100 ml | 4 x 100 ml |
| Další součásti: sáček se zipovým uzávěrem | 1 | 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 soupravy**

* Přesné mikropipety nebo multikanálové mikropipety
* Jednorázové pipetovací špičky
* Odměrný válec se stupnicí pro přípravu mycího roztoku
* 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 zařízení
* Materiál k zakrytí destiček (víčka, aluminiová nebo přilnavá fólie)
* Inkubátor schopný udržet teplotu 37°C (±3°C)
* Třepačka mikrodestiček
* Nepotahované mikrodestičky nebo zkumavky pro přípravu vzorků

**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 naleznete v materiálových bezpečnostních listech.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití činidel 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.
* Veškerý odpad 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**

**Kontroly a vzorky**

Ředění vzorků a kontrolních vzorků závisí na zvoleném protokolu inkubace a provádí se v předřeďovací destičce nebo zkumavkách.

* Krátký protokol (1 hodina (± 5 min.) při +37°C (± 3°C)): předřeďte kontroly a vzorky ředicím pufrem č. 2 v poměru 1:20.
* Noční protokol (16-24 hodin při 2–8°C): předřeďte kontroly a vzorky ředicím pufrem č. 2 v poměru 1:50.

**Mycí roztok**

Mycí koncentrát (10X) č.2 musí být před použitím zředěn destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1:10 (např. 30 ml mycího koncentrátu (10X) a 270 ml destilované vody). Tento roztok je dále nazýván „mycí roztok“.
Poznámka: Mycí koncentrát (10x) č. 2 je nutné zahřát na 18–26°C a promíchat, aby se rozpustily sražené soli. Pokud se uchovává při teplotě 2-8 °C, je mycí roztok stabilní po 3 dny.

**Konjugát**

Koncentrovaný konjugát (100x) zřeďte ředicím pufrem č. 1 v poměru 1:100.
Poznámka: Zředěný roztok konjugátu je při teplotě 18–26°C stabilní po 8 hodin.

**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 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. Rozdělte vzorky a kontroly do určených jamek:
**Krátký protokol: 1 hodina (± 5 min.) při +37°C (± 3°C)**
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK) do dvou jamek.
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK) do dvou jamek
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO testovaného vzorku do zbývajících jamek.
- Promíchejte obsah jamek jemným poklepáváním na destičku, nebo použijte třepačku.
- Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 1 hodiny (±5 min.) při +37°C (±3°C).

**Noční protokol: 16-24 hodin při 2–8°C**
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK) do dvou jamek.
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK) do dvou jamek
- 100 μl ZŘEDĚNÉHO testovaného vzorku do zbývajících jamek.
- Promíchejte obsah jamek jemným poklepáváním na destičku, nebo použijte třepačku.
- Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 16-24 hodin při 2–8°C

3. 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.

4. Do každé jamky přidejte 100 μl ZŘEDĚNÉHO konjugátu.

5. Zakryjte mikrodestičku a inkubujte po dobu 30 minut (±3 min.) při +37°C (±3°C).

6. Opakujte krok č. 3.

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

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

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

10. 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.

11. Výpočty

**Kontrolní vzorky**

PKx = PK1 A(450) + PK2 A(450)

 2

NKx = NK1 A(450) + NK2 A(450)

 2

**Kritéria validity**

PKx ≥ 0,350

PKx / NKx ≥ 3,00

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

**Vzorky**

S/P % = 100 x A(450) vzorku – NKx

 PKx – NKx

12. Interpretace

**Individuální vzorky séra a plazmy:**

Negativní: S/P % ≤ 60

Pozitivní: S/P % > 60

**Hromadné vzorky:**

Negativní: S/P % ≤ 40

Pozitivní: S/P % > 40

**Poznámka:** Společnost IDEXX má k dispozici 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/Konjugovaný koncentrát (100x)/Ředící pufr č. 2** – Může vyvolat alergickou kožní reakci. Škodlivý pro vodní organismy, 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 organismy, 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