*Příbalový leták*

**IDEXX cELISA EIA**

 **Testovací sada na průkaz protilátek proti viru nakažlivé chudokrevnosti koní**

Pouze pro veterinární použití.

**Název a zamýšlené využití**

Testovací sada IDEXX cELISA EIA s využitím kompetitivní metody ELISA (cELISA) je rychlý, praktický a specifický test pro detekci protilátek proti EIA v séru koní. Pro redukci nespecifických reakcí, které se často vyskytují v testech ELISA, je zde použit purifikovaný antigen EIA a monoklonální protilátky proti p26. Korelace mezi testy IDEXX cELISA EIA a IDEXX AGID EIA přesahuje 99 procent.

**Popis a principy**

Sada IDEXX cELISA EIA obsahuje mikrotitrační destičky potažené monoklonální protilátkou specifickou pro p26, hlavní skupinově specifický antigen viru nakažlivé chudokrevnosti koní (EIAV). Antigen p26 byl konjugován s křenovou peroxidázou (HRPO). Koňské sérum se inkubuje simultánně s HRPO-konjugovaným antigenem p26. Sérové protilátky specifické pro p26 soutěží s anti-p26 monoklonálními protilátkami navázanými na destičce o purifikovaný enzymový antigen p26. Po vymytí reziduálního roztoku konjugátu se do každé jamky přidá substrát.
Vyskytují-li se ve vzorku séra koňovitých protilátky proti EIAV p26 antigenu, p26 antigen konjugovaný s HRPO se nemůže navázat na monoklonální protilátku nanesenou v jamkách mikrotitrační destičky a výsledkem je vznik pouze slabého (nebo žádného) zabarvení v pozitivním vzorku. Je-li kůň na protilátky proti EIAV negativní, p26 antigen konjugovaný s HRPO se na monoklonální protilátku v jamkách naváže a v jamkách se vzorkem vznikne silné zabarvení. Rozvoj zbarvení je v inverzním vztahu k množství protilátek proti EIAV. Pro závěrečnou intepretaci testu se zbarvení v jamkách s testovaným vzorkem srovnává se zbarvením v jamkách s pozitivním kontrolním vzorkem.

**Obsah soupravy**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  1  | Destička potažená Anti-EIAV  | 1 ks |
| 2  | Pozitivní kontrolní vzorek – konzervováno thimerosalem | 1 x 6.0 ml |
| 3  | Negativní kontrolní vzorek – konzervováno thimerosalem | 1 x 6.0 ml  |
| 4  | EIAV antigenní konjugát — konzervováno thimerosalem  | 1 x 6.0 ml  |
| A  | TMB Substrát | 1 x 12 ml  |
| B  | Zastavovací roztok  | 1 x 12 ml |

Poznámka: Popis symbolů použitých na popiscích této testovací sady najdete v tabulce na konci originálního letáku.

**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 se stupnicí pro přípravu promývacího roztoku
* Čtečka mikrodestiček s 96 jamkami (vybavená filtrem pro vlnovou délku 620-650 nm)
* Promývací zařízení na mikrodestičky (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu reagencií používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Termostat schopný udržet teplotu 37°C (±2°C)

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Při manipulaci se vzorky a reagenciemi používejte ochranné rukavice / ochranný oděv/ ochranu očí nebo obličeje.
* Další informace najdete v materiálových bezpečnostních listech výrobku.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití reagencií najdete na konci tohoto letáku.

**Laboratorní postupy**

* 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 nepoužité reagencie zpět do nádob.
* Nepoužívejte soupravu po datu exspirace.

**Odběr vzorků**

Test provádějte pouze na koňském séru. Krev odeberte venepunkcí do čisté zkumavky neobsahující aditiva (lze použít zkumavky se separátorem séra). Oddělte sérum.
Vzorky lze uchovávat při teplotě 2–8 °C až po dobu pěti dní. Je-li třeba uchovat vzorky delší dobu, musí být zmrazeny na -20 °C. Vzorky séra lze před testováním zmrazit a rozpustit pouze jednou.
Rozpuštěné vzorky dobře promíchejte převracením zkumavky. Výskyt turbidity nebo viditelných známek růstu bakterií (zakalení čirého séra) může ovlivnit efektivitu a přesnost testu. Hemolyzované, lipemické nebo bakteriálně kontaminované sérum může způsobit chybnost výsledků (výsledky může ovlivnit také krev ošetřená EDTA nebo heparinizovaná).

**Postup testu**

Veškeré reagencie použité v tomto testu musí mít teplotu 18–26°C. Reagencie se míchají jemným obracením nebo kroužením. Neponechávejte konjugát při teplotě 18–26 °C déle než dvě hodiny.

1. Oddělte potřebný počet proužků. Proužky popište a bezpečně uložte do držáku. Na každý vzorek séra použijte jednu jamku, dvě jamky si vyhraďte na dva kontrolní vzorky (A1, A2).
2. Pro každý vzorek použijte novou pipetovací špičku a samostatnou jamku. Do příslušných jamek dejte vždy 100 μL vzorku séra.
3. Do určených jamek dejte 100 μL negativní kontroly (NK) a 100 μL pozitivní kontroly (PK).
4. Do každé jamky přidejte 50 μL antigenního konjugátu EIAV.
5. Důkladně promíchejte (desetkrát poklepejte na držák jamek).
6. Inkubujte nezakryté destičky po 30 minut (± 2 minuty) při 37 °C (± 2 °C).
7. Vymyjte destičky (ručně nebo pomocí promývacího zařízení).

Poznámka: Důkladné vymývání jamek je důležité. Nedostatečně vymytí může způsobit nespecifický rozvoj zbarvení a absenci rozdílu ve zbarvení mezi pozitivní a negativní kontrolou (oba kontrolní vzorky budou tmavě modré).
Ruční vymytí – Vyklepejte reagencie z jamky do výlevky. Vysušte jamky čistým papírovým ručníkem. Nakloňte jamky do úhlu 45° směrem k sobě. Začněte ve spodní řadě a pohybem ze strany na stranu prudce vystříkávejte jamky deionizovanou vodou ze střičky. Zkontrolujte, zda jsou všechny jamky zcela zaplněny vodou bez vzduchových bublin. Vodu z jamek vylijte do výlevky. Opakujte postup pětkrát. Po posledním vypláchnutí vysušte jamky papírovým ručníkem. Během prvních vymývání zabraňte křížové kontaminaci jamek – vylijte reagencie do výlevky a jamky vysušte čistým papírovým ručníkem.

Vymytí automatickou myčkou – Odsajte tekutý obsah všech jamek do vhodné odpadní nádržky. Každou jamku vymyjte 3-5x zhruba 350 μL deionizované vody. Při každém vymývání jamky zcela vyplňte a obsah poté kompletně odsajte.

1. Do každé jamky dejte 100 μL roztoku TMB substrátu.
Poznámka: Používáte-li kapátko, dejte do každé jamky dvě kapky.
2. Důkladně promíchejte (desetkrát poklepejte na držák).
3. Inkubujte destičku po dobu 15 minut (± 1 minuta) při 18–26 °C.
4. Do každé jamky dejte 100 μL zastavovacího roztoku.
Poznámka: Používáte-li kapátko, dejte do každé jamky dvě kapky.
5. Sledujte změnu zbarvení. Za pomoci čtečky změřte a zaznamenejte hodnoty absorbance (optické hustoty) pro všechny jamky při vlnové délce 650 nm. Nemáte-li k dispozici čtečku, lze výsledky testu určit vizuálním srovnáním intenzity zbarvení vzorku s intenzitou zbarvení pozitivní kontroly (viz část Výsledky).
6. Výsledky:
Pro validitu testu musí být zbarvení kontrol následující:

Negativní kontrola – substrát se zbarvil tmavě modře.

Pozitivní kontrola – substrát se zbarvil světle modře.

Poznámka: Nedostatečné vymývání může způsobit absenci rozdílu ve zbarvení mezi negativní a pozitivní kontrolou (oba vzorky budou tmavě modré).

1. Interpretace:

• Pozitivní kontrola musí mít optickou hustotu ≥ 0,150 při vlnové délce 650 nm.

• Pozitivní kontrola musí mít ≤ 70% optické hustoty (O.D.) negativní kontroly při vlnové délce 650 nm.

• O.D. pozitivních vzorků ≤ O.D. pozitivní kontroly.

• O.D. negativních vzorků > O.D. pozitivní kontroly.

• Mírná nebo žádná změna zbarvení testovaného vzorku indikuje přítomnost protilátek proti EIAV v séru.
- Vzorky se stejným nebo slabším zbarvením, než má světle modrá pozitivní kontrola jsou pozitivní.
- Některé pozitivní vzorky mohou být čiré (bez zbarvení).
- Pozitivní výsledky testu se doporučuje ověřit testem EIA AGID.

• Změna zbarvení vzorku intenzivnější než u světle modré pozitivní kontroly indikuje nepřítomnost protilátek proti EIAV v séru. Vzorky s intenzivnějším zbarvením než u světle modré pozitivní kontroly jsou negativní.

• Vzorky, které nelze snadno vizuálně interpretovat kvůli podobné intenzitě zbarvení jako u pozitivní kontroly jsou považovány za sporné. Optickou hustotu takovýchto vzorků se doporučuje stanovit pomocí čtečky, případně vzorky odeslat do národní laboratoře orgánu veterinární péče pro potvrzení.

Poznámka:

Společnost IDEXX má k dispozici přístrojové a softwarové systémy, které poskytují výpočty výsledků a souhrny údajů.

Prodej a použití ve Spojených státech je omezen pouze na laboratoře schválené státními a federálními úřady (USDA).

Prodej a použití této sady v jiných zemích může být omezeno veterinárními regulačními orgány.

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)

U.S. Vet. Licence č. 313

Kód výrobku: 5515.00

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.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Veškerá práva vyhrazena.

UPOZORNĚNÍ

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

**Zastavovací roztok** – Způsobuje mírné podráždění pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné rukavice/brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: vyhledejte lékařskou pomoc/poraďte se s lékařem. Přetrvává-li podráždění očí: vyhledejte lékařskou pomoc/poraďte se s lékařem.

Výrobce Zástupce pro EU

IDEXX Laboratories, Inc. IDEXX Europe B.V.

One IDEXX Drive P.O. Box 1334

Westbrook, Maine 04092 2130 EK Hoofddorp

USA Nizozemsko