**Testovací souprava k prokázání protilátek proti Actinobacillus pleuropneumoniae**

Pouze pro veterinární užití

**Název a zamýšlené použití**

Souprava IDEXX APP-ApxIV ELISA nabízí rychlou, jednoduchou a specifickou metodu stanovení protilátek proti Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), patogenu způsobujícímu prasečí pleuropneumonii, v séru a plazmě prasat nezávisle na sérotypu APP. Umožňuje odlišit očkovaná (negativní výsledek testu) od infikovaných (pozitivní výsledek testu) zvířat.

**Popis a principy**

Mikrotitrační destičky jsou dodávány potažené rekombinantním bakteriálním antigenem ApxIV. Zředěné vzorky k testování jsou inkubovány v jamkách těchto destiček. Protilátky specifické pro ApxIV se zde navážou na antigen a vytvoří komplex antigen/protilátka na povrchu jamek destičky. Nenavázaný materiál se odstraní vymytím. Následně je přidán peroxidázou značený konjugát anti-prasečí-IgG, který se váže na prasečí protilátky komplexované antigenem ApxIV.   
Po vymytí nenavázaného konjugátu se přidává do jamek TMB substrát. Následně vyvinuté zabarvení (optická hustota měřena při 450 nm) je přímo úměrné množství ApxIV specifických protilátek ve vzorku. Výsledek je získán srovnáním optické hustoty (OH) vzorků s OH pozitivního kontrolního vzorku.

**Reagencie Objem**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená antigenem APP ApxIV | 5 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek | 1 x 0,9 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek | 1 x 0,9 ml |
| 4 | Konjugát | 1 x 60 ml |
| 5 | Roztok na ředění vzorků | 1 x 100 ml |
| A | TMB substrát č. 12 | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok č. 3 | 1 x 60 ml |
| C | Promývací koncentrát (10x) | 1 x 480 ml |
|  | **Ostatní komponenty**: sáček se zipovým uzávěrem | 1 |

Poznámka: Popis mezinárodních symbolů používaných na štítcích této soupravy najdete v tabulce na konci příbalového 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 přístroje na současné pipetování více dávek

• jednorázové pipetovací špičky

• odměrný válec na promývací roztok opatřený stupnicí

• mikrodestička s 96 jamkami (vybavená filtrem s jednou vlnovou délkou 450 nm nebo s dvěma vlnovými délkami 450 nm a 650 nm)

• mycí zařízení na mikrodestičku (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)

• destilovaná nebo deionizovaná voda pro přípravu reagencií používaných při testu (vždy používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu)

•kryt mikrodestičky (víko, hliníková fólie nebo lepicí)

• vortex nebo ekvivalentní třepací zařízení

• vlhká komora nebo inkubátor, schopný udržet teplotu +37°C (±3°C)

**Upozornění a varování pro uživatele**

• S veškerým biologickým materiálem nakládejte jako s potenciálně infekčním materiálem.

• Při manipulaci se vzorky a reagenciemi používejte ochranné rukavice / ochranné oblečení / ochranné prostředky na oči nebo obličej.

• Další informace najdete v bezpečnostním listu 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 mytí během postupu. Pro každý vzorek a každý kontrolní vzorek používejte novou špičku pipety.

• 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 a nemíchejte komponenty ze souprav s různými čísly šarže.

**Příprava reagencií**

**Mycí roztok**

Mycí koncentrát (10X) je třeba temperovat na 18–26 °C a smíchat, aby se rozpustily všechny sražené soli. Mycí koncentrát je třeba před použitím zředit v poměru 1 ku 10 destilovanou/deionizovanou vodou (např. 30 ml koncentrátu plus 270 ml vody na destičku, která se má použít). Je-li mycí roztok připraven ve sterilních podmínkách, může se uchovávat při teplotě 2–8 °C po dobu jednoho týdne.

**Příprava vzorků   
Vzorky a kontroly**

Předřeďte vzorky a kontrolní vzorky ve zkumavkách ředicím roztokem v poměru 1:10 (např. 15 μL vzorku + 135 μL ředicího roztoku).

**Postup testu**

Všechny reagencie je třeba před použitím nechat temperovat na 18–26 °C. Reagencie se míchají mírným obracením a kroužením.

1. Připravte potažené destičky a zapište polohu vzorku na pracovním listu. Používáte-li části destiček, vezměte pouze jamky dostatečné pro testované vzorky. Zbývající destičky spolu s vysoušecím prostředkem uložte do sáčku se zipovým uzávěrem obsaženým v soupravě a vraťte do prostředí s teplotou 2–8 °C.

2. Do dvou jamek dejte 100 µl ZŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK).

3. Do dvou jamek dejte 100 µl ZŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK).

4. Do příslušných jamek dejte 100 µl ZŘEDĚNÝCH vzorků.

5. Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 60 minut (±5 minut) při 37 °C. Destičky musí být těsně uzavřeny nebo inkubovány ve vlhké komoře chráněny kryty destiček, aby se zabránilo jakémukoli odpařování.

6. Vylijte tekutinu z mikrotitrových jamek a každou jamku pětkrát vymyjte přibližně 300 µl mycího roztoku. Tekutý obsah jamek po každém mytí odstraňte. Po posledním odstranění tekutiny odstraňte zbývající mycí tekutinu z každé destičky poklepáváním na savý materiál. Destička nesmí mezi umýváním a před přidáním příští reagencie vyschnout.

**Důležité – Doporučené nastavení pro automatické mytí destiček:**

* **Dávkujte mycí roztok v přepadové pozici (doporučený průtok 200 μL/s).**
* **Zvolte nízkou rychlost aspirace (doporučeno 5 mm/s) a vysoký stupeň aspirace (3 až 5).**
* **Finální pozice aspiračních trnů by měla být zhruba 1 mm nade dnem jamky.**
* **Nepoužívejte spodní mytí ani podobné režimy.**

7. Do každé jamky dejte 100 µl konjugátu.

8. Zakryjte destičku a inkubujte po dobu 1 hodiny (±5 minut) při +37°C (± 3°C). . Destičky musí být těsně uzavřeny nebo inkubovány ve vlhké komoře chráněny kryty destiček, aby se zabránilo jakémukoli odpařování.

9. Opakujte krok 6.

10. Do každé jamky dejte 100 µl TMB substrátu č. 12.

11. Inkubujte mimo dosah přímého světla po dobu 15 minut (±1 minuta) při +37°C (± 3°C).

12. Do každé jamky dejte 100 µl zastavovacího roztoku č. 3.

13. Změřte a zaznamenejte optickou hustotu vzorků a kontrolních vzorků při 450 nm.

14. Výpočet výsledků:   
(PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola)

Kontrolní vzorky:   
NK~~x~~ = NK1 A(450) + NK2 A(450) PK~~x~~ = PK1 A(450) + PK2 A(450)  
 2 2

Kritéria validity:  
NKx ≤0.300 PKx ≤ 2.000 PKx –NCx≥ 0.3

U neplatných analýz bude pravděpodobnou příčinou technika; po důkladném prostudování příbalového letáku analýzu zopakujte.

Vzorek

V/P % = 100 X A(450) vzorku – NK~~x~~

PK~~x~~ – NK~~x~~

15. Interpretace:

Negativní: V/P % < 40 %

Podezřelý: 40 % ≤ V/P % < 50 %

Pozitivní: V/P % ≥ 50 %

Zůstává-li vzorek podezřelý i po druhém opakování testu, doporučuje se analyzovat nový vzorek odebraný tomuto zvířeti. Pokud je nový vzorek také podezřelý, měla by být zvážena epidemiologická situace. Je-li to možné, znovu analyzujte vzorek jinou metodou.

**Poznámka:** Společnost IDEXX má přístrojové a softwarové systémy, které vypočítávají výsledky a poskytují souhrny dat.

**Varování:**

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

TMB substrát: Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranné brýle / obličejový štít.   
Dojde-li k podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

H302/H315/H317/H319/H335/P280/P333+P313/P337+P313/P363

Zastavovací roztok: Zdraví škodlivý při požití. Může způsobit podráždění kůže. 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.   
Kontaminované oblečení před opětovným použitím vyperte.

Popis symbolů:

Číslo šarže   
Sériové číslo  
Katalogové číslo  
Diagnostika *in vitro*  
Autorizovaný obchodní zástupce pro Evropu  
Pozitivní kontrola  
Negativní kontrola  
Datum spotřeby  
Datum výroby  
Výrobce  
Teplotní omezení  
Viz. návod k použití  
Zásadní změna v návodu k použití