**SERELISA® ParaTB Ab Mono Indirect**

**Diagnostická souprava pro detekci protilátek proti**

***Mycobacterium paratuberculosis* – návod k použití**

In-vitro diagnostická souprava pro detekci specifických protilátek proti *M. a. paratuberculosis* v bovinním séru a plazmě.

**Obecné informace**

Johnova choroba je způsobována infekcí *Mycobacteium avium subspecies paratuberculosis*. Jedná se o chronické zánětlivé střevní onemocnění charakterizované perzistentními a progresivními průjmy, ztrátou váhy, vyčerpáním, vyhublostí a v konečné fázi úhynem. Toto ekonomicky nákladné onemocnění je rozšířené u přežvýkavců po celém světě. Bakterie *M. paratuberculosis* je masivně vylučována do okolí trusem infikovaných zvířat. Další zvířata se infikují požitím kontaminovaného krmiva či vody. Telata se infikují v raném věku z vemena znečištěného trusem, mlékem či kolostrem infikované matky nebo přímo v kontaminovaném kotci. Nejvyšší incidence infekce je do dvou let stáří, kdy postupně začíná věková rezistence k onemocnění. Bakterie infikuje makrofágy ve sliznici tenkého střeva a v přilehlých mízních uzlinách. Pokud se organismus nezbaví patogenu buňkami zprostředkovanou imunitní odezvou, bakterie se dále pomnožuje za vzniku chronické enteritidy, která vede k vylučování bakterie v trusu, příznakům vyhublosti a klinickému onemocnění. Choroba se vyznačuje dlouhou inkubační dobou a může trvat několik měsíců až několik let než je možné onemocnění diagnostikovat detekcí mikroorganismů v trusu nebo detekcí specifických protilátek.

SERELISA® ParaTB Ab ELISA je rychlý a specifický nepřímý screeningový test na detekci specifických protilátek proti *Mycobacteium avium subspecies paratuberculosis* v bovinním séru či plazmě.

Princip testu je následující: Vzorky séra získané ze stáda vystaveného antigenům Pata TB obsahují specifické protilátky proti ParaTB. Sérum, naředěné v ředícím roztoku na vzorky (SD) – obsahuje extrakt *Mycobacterium phlei*), je přidané do jamek, jejichž dno je pokryté antigenem. Specifické protilátky v séru pak vytváří komplex protilátka-antigen s antigenem vázaným na mikrodestičce. Po promytí desky je přidán do každé jamky peroxidázový (HRP) monoklonální anti-bovinní IgG konjugát. Konjugát se váže na komplex antigen-protilátka z předchozího kroku. Po krátké inkubaci je nenavázaný konjugát odstraněn druhým promývacím krokem. Následně je do každé jamky přidán substrát obsahující chromogen (ABTS). Změna barvy chromogenu (z čiré na zelenomodrou) nastává v přítomnosti enzymu peroxidázy. Relativní intenzita zabarvení, která vznikne během 15 minut (porovnávaná s kontrolami) je přímo úměrná hladině protilátek přítomných v testovaném séru. Po inkubaci se substrátem je přidán do každé jamky zastavovací roztok, aby došlo k ukončení reakce a destička je pak připravená k odečtení v ELISA spektrofotometru při vlnové délce 405-410 nm.

REAGENCIE POTŘEBNÉ K PROVEDENÍ 92 TESTŮ

a) 1 mikrotitrační destička s navázaným ParaTB antigenem

b) 20 ml ředícího roztoku na vzorky **(SD)**

c) 10 μl 40X negativní kontrolní sérum **(N)**

d) 10 μl 40X pozitivní kontrolní sérum **(P)**

e) 110 μl 100X anti-bovinního IgG HPR konjugátu **(C)**

f) 1 ml ředícího roztoku na konjugát **(CD)**

g) 20 ml 20X promývacího roztoku **(W)**

h) 11 ml roztoku substrátu **(ABTS)**

i) 2,5 ml 5X zastavovacího roztoku **(S)**

ZAJISTĚTE, ABY VŠECHNY REAGENCIE PŘED POUŽITÍM V TESTU DOSÁHLY LABORATORNÍ TEPLOTY!

POŘEBNÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL (NEDODÁVANÉ V SOUPRAVĚ)

a) vysoce přesné pipety (např. pipeta na 1-20 μl)

b) 0,2 ml; 1,0 ml; a 5,0 ml pipety a špičky

c) 8 nebo 12-ti kanálové pipety (nebo automatizovaný přístroj)

d) 2 kalibrované válce (100 ml a 1000 ml)

e) 1ml nebo 5 ml borosilikátové skleněné zkumavky

f) čisté mikrotitrační 96 jamkové destičky

g) destilovaná (nebo reverzní osmóza) voda

h) spektrofotometr pro 96 jamkové destičky s filtrem na 405-410 nm

i) promývačku na destičky (manuální nebo automatizovanou)

j) kontejner na odpad s dezinfekčním roztokem

VAROVÁNÍ PRO UŽIVATELE REAGENCIÍ A DESTIČEK S ANTIGENEM

a) Zacházejte se všemi reagenciemi a se vzorky jako s materiálem s biologickým rizikem.

b) Zabraňte vniku reagencií do očí a na kůži. V případě zasažení okamžitě opláchněte postižená místa velkým množstvím čisté studené vody.

c) Promývací roztok, kontrolní séra, testovací destičky, terénní vzorky a další reagencie ze soupravy musí být před likvidací důkladně dekontaminovány dle požadavků norem.

d) Dbejte zvláštní opatrnosti, abyste nekontaminovali některou z reagencií soupravy např. vzorkem séra či bakteriální kontaminací.

e) Každá destička je vybavena indikátorem vlhkosti. Pokud se některý z indikátorů zabarví do růžova, může být daná destička částečně znehodnocena; takovou destičku dekontaminujte (např. promytím dezinfekčním roztokem) a zlikvidujte.

f) Nejlepší výsledky budou dosaženy striktním dodržováním pracovních postupů popsaných níže, s využitím správné a bezpečné laboratorní praxe.

g) Nepoužívejte soupravu po datu exspirace.

h) **NIKDY NEPIPETUJTE ÚSTY**.

Identifikace nebezpečnosti: Nebezpečný při požití. Dráždí oči, dýchací orgány a kůži. V případě zasažení očí okamžitě propláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařské ošetření. Do produktu nikdy nepřidávejte vodu. Používejte příslušný ochranný oblek.

**SKLADOVÁNÍ**

**Skladujte všechny reagencie dodávané v soupravě při 2-8 °C. Reagencie nesmí být zamrazené.**

**ODBĚR VZORKŮ**

Správný odběr vzorků, příprava séra a skladování vzorků (4 °C do 4 dnů nebo -20 °C na delší období) jsou nutné pro získání správných laboratorních výsledků. Do testu používejte pouze kvalitní sérum (např. bez bakteriální kontaminace, silné hemolýzy či sraženého tuku).

**ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

Vzorky řeďte s pomocí ředícího roztoku vzorků (**SD**) v čisté, nové 96jamkové mikrotitrační destičce bez navázaného antigenu. Zamražené vzorky musí být před použitím kompletně rozmraženy a důkladně promíchány.

**PŘÍPRAVA DESTIČKY NA ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

a)Napipetujte **95 μl ředícího roztoku vzorků** (**SD**) do všech jamek čisté mikrotitrační destičky. Tuto destičku dále nazývejme ředící destičkou.

b)Přidejte **5 μl testovaného vzorku** do každé jamky (výsledné ředění = **1:20**). Začněte v jamce A5 a zakončete v jamce H12 (ve směru zleva doprava, řada jamek za řadou). Např. jamky 1-30 mohou obsahovat ředěná séra z farmy č. 1, jamky 31-60 mohou obsahovat ředěná séra z farmy č. 2 apod.

c) Přidejte **5 μl negativního kontrolního séra (N)** (výsledné ředění = **1:20**) do jamek A3 a A4.

d) Přidejte **5 μl pozitivní kontrolního séra (P)** (výsledné ředění = **1:20**) do jamek A1 a A2.

e) Před přenesením na detekční destičku ponechte všechna ředěná séra s ředícím roztokem 5 minut v ředící destičce.

**ALTERNATIVNÍ PŘÍPRAVA SÉR A KONTROL**

V případě malého počtu vzorků nepotřebujeme ředící destičku. **Všechny vzorky a kontroly mohou být naředěny 1:40** s ředícím roztokem vzorků v kónických zkumavkách (dobře promíchejte, doporučujeme vortexování) a pak rovnou přidány do testovacích jamek k první 30minutové inkubaci. Nepoužité jamky vraťte do zipového sáčku s desikantem.

**PŘÍPRAVA ROZTOKU KONJUGÁTU**

HRP konjugovaná monoklonální anti-bovinní IgG protilátka je dodávaná jako koncentrát (100X) v HRP stabilizéru. Nařeďte **110 μl** základního roztoku konjugátu **(C)** v**10,89 ml** ředícího roztoku konjugátu (CD) s výsledným ředěním **1:100**. Dobře promíchejte, doporučuje se vortexování. Výsledný objem (11 ml) je dostatečné množství konjugátu na jednu 96jamkovou ELISA destičku.

**PŘÍPRAVA PROMÝVACÍHO ROZTOKU (1x)**

Nařeďte **20 ml** koncentrovaného promývacího roztoku **(W)** v**380 ml** destilované (nebo R.O. upravené) vody (**1:20**). Dobře promíchejte. Výsledný objem (400 ml) je dostatečné množství promývacího roztoku potřebného na jednu 96jamkovou ELISA destičku.

**PŘÍPRAVA SUBSTRÁTU**

Roztok substrátu (**ABTS**) je dodáván připravený k použití. Na každou desku je potřeba 11 ml substrátu. Pro správné výsledky je nutné nechat substrát vytemperovat na laboratorní teplotu.

**PŘÍPRAVA ZASTAVOVACÍHO ROZTOKU (1X)**

Nařeďte **2,5 ml** koncentrovaného zastavovacího roztoku **(S)** v 10 ml destilované (nebo R.O. upravené) vody (**1:5**). Dobře promíchejte. Výsledný objem (12,5 ml) je dostatečné množství zastavovacího roztoku potřebného na jednu 96jamkovou ELISA destičku.

**POZNÁMKA: Skladování koncentrovaného zastavovacího roztoku (S) v ledničkové teplotě může způsobovat vznik bílého pevného zákalu. Toto neovlivňuje výsledek testu. Na rozpuštění zákalu nechte koncentrovaný zastavovací roztok (S) vytemperovat na laboratorní teplotu nebo ohřejte na 37 °C.**

**POSTUP ELISA TESTU**

**PŘÍPRAVA TESTOVACÍ DESTIČKY**

a) Vyndejte detekční destičku s antigenem (nebo požadovaný počet stripů) ze zipového sáčku a označte umístění vzorků podle ředící destičky.

b) Přidejte **50** **μl ředícího roztoku (SD)** do všech jamek testovací destičky.

c) S použitím 8 nebo 12kanálové pipety přemístěte **50 μl** každého naředěného séra a kontrol z ředící destičky do korespondujících jamek testovací destičky (výsledné ředění bude **1:40).** Vyměňujte pipetovací špičky po každé řadě vzorků.

d) **Inkubujte destičku 30 minut** (±5 min) v laboratorní teplotě (23 °C ± 5 °C).

**PROMÝVÁNÍ**

e) Odstraňte manuálně nebo automatizovanou promývačkou obsah všech jamek do příslušného odpadního kontejneru.

f) S použitím 8 nebo 12kanálové pipety (nebo automatem) dejte do každé jamky přibližně **300** **μl promývacího roztoku (1X).**

g) Nechte **promývací roztok působit v jamkách 10-15 sekund** a pak odstraňte manuálně nebo automatizovanou promývačkou obsah všech jamek do příslušného odpadního kontejneru.

h) **Výše popsaný promývací postup opakujte ještě 2x**. Po konečném promytí desku otočte a jemně vyklepejte na savý papír.

**POZN. Promývací krok je velmi kritická část jakéhokoliv ELISA testu. Prosím dodržujte všechny výše popsané kroky.**

**PŘIDÁNÍ KONJUGÁTU (1X), SUBSTRÁTU A ZASTAVOVACÍHO ROZTOKU**

i)S použitím 8 nebo 12kanálové pipety dejte do každé jamky **100 μl naředěného konjugátu (příprava viz výše).** Vyhoďte použité špičky.

j) **Inkubujte destičku 30 minut** (±5 min) v laboratorní teplotě (23 °C ± 5 °C).

k) **Opakujte promývací postup** (viz výše - kroky e-h)

l) S použitím 8 nebo 12kanálové pipety dejte do každé jamky **100** **μl roztoku substrátu (ABTS).** Vyhoďte použité špičky.

m) **Inkubujte destičku 15 minut** (±1 min) v laboratorní teplotě (23 °C ± 5 °C).

n) S použitím 8 nebo 12kanálové pipety dejte do každé jamky **100 μl naředěného zastavovacího roztoku** (příprava viz výše).

o) Změřte destičku v ELISA spektrofotometru s filtrem **405-410 nm**. Před měřením se ujistěte, že v jamkách nejsou žádné bubliny.

**VÝSLEDKY**

**Kontrolní hodnoty testu**

Výsledky ELISA testu jsou validní, pokud průměrná optická densita (OD) *negativní kontroly* je menší než 0,25 a pokud hodnota OD *pozitivní kontroly* je mezi 0,4 a 1,2. Pokud není jeden z výše uvedených parametrů dodržen, není test validní a je nutné testování vzorků opakovat.

**Manuální zpracování dat**

a) Vypočítejte si průměrnou optickou densitu (OD) u negativní kontroly s využitím hodnot z jamek A3 a A4. Vypočítejte si průměrnou optickou densitu (OD) u pozitivní kontroly s využitím hodnot z jamek A1 a A2. Zaznamenejte si oba průměry.

b) Odečtěte průměrné OD negativní kontroly od průměrné OD pozitivní kontroly. Výsledný rozdíl je *upravená (správná) hodnota pozitivní kontroly*.

c) Vypočítejte poměr vzorku k pozitivní kontrole (S/P) tak že odečtete průměrnou OD negativní kontroly od každého vzorku. Rozdíl je následně vydělen upravenou hodnotou pozitivní kontroly.

**S/P = (OD VZORKU) – (PRŮMĚRNÁ *OD* NEGATIVNÍCH KONTROL)**

**UPRAVENÁ HODNOTA *OD* POZITIVNÍ KONTROLY**

Příklad:

1. Příklad OD pozitivní kontroly:

0,585 a 0,605

Průměr = (0,585 + 0,605) / 2 = 0,595

2. Příklad OD negativní kontroly

0,072 a 0,062

Průměr = (0,072 – 0,062) / 2 = 0,067

3. Upravená pozitivní hodnota:

(0,596) – (0,067) = 0,528

4. Příklad výpočtu S/P hodnoty:

(0,560) – (0,067) / 0,528 = 0,934

**Interpretace výsledků**

ParaTB ELISA S/P poměry a /nebo ELISA titry získané ze vzorků sér musí být interpretovány dle následujících kritérií:

Vzorek / Pozitivní kontrola předpokládaná PraTB

**S/ P** poměr Stav protilátek

**< 0,70 Negativní** (a)

**≥ 0,70 Pozitivní** (b)

a. Negativní: Vzorky séra s ParaTB S/P poměrem < 0,70 jsou hodnoceny jako negativní na přítomnost protilátek proti ParaTB. Existuje ovšem mnoho faktorů, které mohou vést k negativním ELISA výsledkům v infikovaném stádě, jako např. různé odchylky vykazující atypické biologické a /nebo antigenní vlastnosti, prevalence ParaTB ve stádě, načasování a náhodný výběr při odběru vzorků apod. Proto je doporučováno, že jako negativní má být stádo posuzováno pokud:

(1) byl odebrán a testován reprezentativní počet vzorků ze stáda a to opakovaně a vždy s negativním výsledkem v ELISA testu a

(2) byl odebrán a testován reprezentativní počet vzorků ze stáda a to opakovaně a vždy s negativním výsledkem s použitím  standardních konvenčních diagnostických metod (kultivace, PCR apod.).

b. Pozitivní: Vzorky séra s ParaTB S/P poměrem ≥ 0,70 jsou hodnoceny jako pozitivní na přítomnost protilátek proti ParaTB. Ve stádě s potvrzenou přítomností anti-ParaTB protilátek je pak doporučováno použití dalšího konfirmačního testování s použitím standardních diagnostických metod a tak potvrdit pozitivní diagnózu ParaTB infekce ve stádě.

Technická podpora:

Pokud chcete získat informace o tomto veterinárním diagnostickém přípravku, kontaktujte prosím držitele rozhodnutí o schválení:

Zoetis Česká republika s.r.o., náměstí 14. října 642/17, 150 00 Praha 5, Česká republika

Tel: +420 257 101 111

E-mail: infovet.cz@zoetis.com

POUZE PRO VETERINÁRNÍ ÚČELY/

POUZE PRO POUŽITÍ IN VITRO