*Příbalový leták*

**IDEXX M.bovis**

**Testovací sada na průkaz protilátek proti *Mycobacterium bovis***

Ověřena a certifikována OIE pro účely definované v tomto letáku pod registračním číslem 20120107.

Pouze pro veterinární použití.

Název a zamýšlené užití

Testovací sada IDEXX M. bovis je určena pro detekci protilátek proti *Mycobacterium bovis (M. bovis)*ve vzorcích hovězího séra a plazmy. Test je navržen pro použití společně s dalšími metodami pro diagnostiku a zvládání tuberkulózy, není však vhodný pro stanovování, zda je konkrétní zvíře nebo stádo prosté nákazy.

Prohlášení OIE

Validační údaje pro testovací sadu IDEXX M. bovis na průkaz protilátek proti *M. bovis* byly certifikovány OIE v květnu 2012 na základě odborných posudků, test je vhodný pro detekci protilátek proti *M. bovis* ve vzorcích hovězího séra a plazmy a k použití jako doplňkový test v kombinaci s dalšími metodami pro diagnózu a zvládání tuberkulózy.

Test má dále využití při provádění sérologického průzkumu ke zjištění prevalence a rizika infekce M. bovis na úrovni managementu stád.

Obecné informace

Bovinní tuberkulóza, způsobovaná bakterií *M. bovis* zůstává i nadále v mnoha zemích významným onemocněním dobytka, jejíž kontrolu a vymýcení komplikují nejen chybějící citlivé testy, ale i přítomnost závažných rezervoárů v divoké zvěři. Ačkoli testy na tuberkulózu na základě buněčné imunitní odpovědi (kožní test, gama interferony) mohou odhalit zvíře v raném stádiu infekce, stále nedokážou zachytit až 20 % skutečně infikovaných zvířat.1 Strategické doplňkové použití testu protilátek proti *M. bovis* může přispět k celkové diagnostické síle, a to detekcí podskupin infikovaných zvířat, která nejsou zachycena momentálně používanými metodami. 2,3,4

Popis a principy

Testovací sada IDEXX M. bovis na průkaz protilátek proti *M. bovis* je enzymatický imunotest pro detekci přítomnosti protilátek proti *M. bovis* ve vzorcích bovinního séra a plazmy. Mikrotitrační formát testu byl vytvořen nanesením rekombinantního antigenu *M. bovis* do jamek 96-jamkových mikrotitračních destiček. Během inkubace testovaného vzorku v potažené jamce vytvoří protilátky proti *M. bovis* komplex s nanesenými antigeny. Po vymytí nenavázaného materiálu z jamek se přidá anti-bovinní konjugát křenové peroxidázy, který se naváže na bovinní protilátky zachycené v jamkách.

Nenavázaný konjugát se vymyje a přidá se TMB substrát. Následný rozvoj zbarvení se odvíjí od množství navázaných protilátek proti *M. bovis*.

Obsah soupravy

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destička potažená antigenem M. bovis  | 5 ks |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek — konzervováno azidem sodným | 1 x 0.05 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek — konzervováno azidem sodným | 1 x 0.05 ml |
| 4 | Konjugát — anti-bovinní: IgG HRPO konjugát | 1 x 60 ml |
| 5 | Roztok k ředění vzorků — konzervováno azidem sodným | 1 x 120 ml |
| A | TMB substrát | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok | 1 x 60 ml |
| C | Promývací roztok koncentrát (10X) — fosfát/tween; konzervováno gentamicinem | 1 x 235 ml |
| Další komponenty: Uzavíratelný sáček | 1 |

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 s vlnovou délkou 450 nm)
* Promývací zařízení na mikrodestičky (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu reagencií používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka
* Zkumavky na ředění vzorků
* Materiál na zakrytí destiček (víčka, aluminiová nebo přilnavá fólie)

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními.
* Při manipulaci se vzorky a reagencii používejte ochranné rukavice / ochranné oblečení / ochranu očí nebo obličeje.
* Další informace najdete v materiálových bezpečnostních listech.
* 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 a nezaměňujte součásti ze souprav s různými sériovými čísly.

Odběr vzorků

Testovat lze buď čerstvé, nebo zmrazené vzorky séra či plazmy. Veškeré rozmrazené vzorky musí být před ředěním důkladně promíchány.

Příprava reagencií

Promývací roztok

Promývací roztok koncentrát (10X) může při skladovací teplotě 2–8 °C vytvářet sraženiny; před ředěním se ujistěte, že je zcela rozpuštěn. Pro přípravu promývacího roztoku přeneste 50 ml koncentrátu (10X) do odměrné baňky nebo odměrného válce o objemu 500 ml; přidejte 450 ml destilované/deionizované vody a důkladně promíchejte. Zředěný roztok lze skladovat při teplotě 18–26 °C po dobu až 3 dní, nebo při teplotě 2–8 °C po dobu až 2 týdnů.

Vzorky a kontrolní vzorky

Testované vzorky a kontrolní vzorky z testovací sady zřeďte ředicím roztokem v poměru 1:50 (1 díl vzorku na 49 dílů ředicího roztoku). Kontrolní vzorky z testovací sady musí být v každé sérii testovány jako duplikáty.

**Postup testu**

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

1. Vyjměte potažené destičky z obalu 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. Do duplikátních jamek dejte 100 μl ZŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK).

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

4. Do vyhrazených jamek dejte 100 μL ZŘEDĚNÉHO vzorku. Vzorky se doporučuje testovat ve dvou opakováních, ale lze i jen v jednom.

5. Zakryjte jamky a inkubujte při teplotě 18–26 °C po dobu 60 minut (±5 minut).

6. Odstraňte roztok a každou jamku 3-5x propláchněte asi 300 μl promývacího roztoku. Mezi vymýváním a před přidáním další reagencie nenechte destičku vyschnout. Pro odstranění zbylého promývacího roztoku po posledním vymytí destičkou poklepejte na savý materiál.

7. Do každé jamky dejte 100 μL konjugátu.

8. Zakryjte jamky a inkubujte při teplotě 18–26 °C po dobu 30 minut (±2 minuty).

9. Opakujte krok 6.

10. Do každé jamky dejte 100 μL TMB substrátu.

11. Zakryjte jamky a inkubujte při teplotě 18–26 °C po dobu 15 minut (±1 minuta).

12. Do každé jamky přidejte 100 μl zastavovacího roztoku.

13. Změřte a zaznamenejte absorbanci vzorků při 450 nm, A(450).

14. Výpočty:

**Kontrolní vzorky**

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

**Kritéria validity**

NKx ≤ 0,200 PKx ≥ 0,300

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

**Vzorky**

S/P =Vzorek A(450) – NKx PKx – NKx

Přítomnost nebo nepřítomnost protilátek proti *M. bovis* se určuje výpočtem poměru absorbance vzorku k pozitivnímu kontrolnímu vzorku (S/P) pro každý vzorek zvlášť.

15 Interpretace:

Negativní Pozitivní

S/P < 0,30 S/P ≥ 0,30

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

Omezení použití

Negativní výsledek testu nevylučuje možnost infekce *M. bovis*. Protilátky proti *M. bovis* se mohou vyskytnout přechodně nebo se vytvořit až v pozdějších fázích infekce a také ne všechna infikovaná zvířata vykazují pozitivní reakci. Pozitivní výsledek testu u testovaného zvířete naznačuje přítomnost protilátek proti *M. bovis*. Vzhledem k možnosti expozice a reakce na mykobakterie přítomné v prostředí (např. *M. kansasii)* by měly být při klasifikování zvířete či stáda zohledněny výsledky všech testů na tuberkulózu (kožní test, test na gama interferon a test ELISA na protilátky) v kombinaci s anamnézou stáda. Na základě testu nelze prohlašovat zvíře či stádo za prosté nákazy.

Certifikace OIE

Souhrn validačních studií

Komplexní informace najdete v registru diagnostických testů na [www.oie.int](http://www.oie.int).

Analytické charakteristiky:

Přesnost: CV destiček (optická hustota negativního kontrolního vzorku): 14,5 % - 17.7 %
CV destiček (optická hustota slabě pozitivního vzorku) = 8,7 % - 11,9 %
CV destiček (optická hustota středně pozitivního vzorku) = 5,7 % - 10,3 %

Opakovatelnost: Mezi destičkami (hodnota S/P pro nejednoznačný vzorek) = 18 % - 27 %
Mezi destičkami (hodnota S/P pro pozitivní vzorek) = 12 % - 21 %

Analytická specificita:
Data indikují, že tato testovací sada je velmi specifická vůči jiným mykobakteriím z prostředí (např. M*. avium, M. paratuberculosis, M. kansasii*). Izolace *M. kansasii* jsou vzácné, nicméně infekce *M. kansasii* (vysokými dávkami) může způsobit falešně pozitivní výsledky, což zdůrazňuje omezení screeningových testů založených na proteinech obsažených v různých druzích mykobakterií.

Analytická citlivost: Nelze uplatnit

Diagnostické charakteristiky

Stanovení hranice rozsahu testu (cut-off)
Hranice rozsahu hodnoty S/P (poměr vzorku vůči pozitivní kontrole) byla stanovena zaměřením na celkovou specificitu testu 97 – 98 % během vývoje testu.

 Odhady diagnostické citlivosti (DSn) a specificity (DSp)

Hladiny uvedené níže jsou založeny na třech různých šaržích testu ELISA, vyrobených s významnou biologickou diverzitou oproti komponentům testovací sady.

Výsledky M. bovis ELISA - porovnání s pozitivními kulturami a vzorky z vybraných stád nebo oblastí prostých TBC.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Hodnocená testovací metoda | IDEXX M. bovis – ELISA protilátek | Cílový druh (Skot) |
| Diagnostická citlivost(stanoveno na pozitivních kulturách *M. bovis*) | N | 307 |
| DSn | (64,6 %) |
| CI | (59,7 % - 69,5 %) |
|  |  |  |
| Diagnostická specificita(vzorky z oblastí prostých TB) | N | 1473 |
| DSp | (98 %) |
| CI | (97,5 % - 98,4 %) |

Výsledky porovnání

Hladina citlivosti indikovaná níže je založena na třech různých šaržích testu ELISA s významnou biologickou diverzitou oproti komponentům testu. Údaje o specificitě jsou reprezentativní pouze pro jednu šarži testu ELISA.

Porovnání výsledků M. bovis ELISA s pozitivními a negativními výsledky z testu SICCT (srovnávací test pomocí cervikálního tuberkulinu)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Hodnocená testovací metoda | IDEXX M. bovis – ELISA protilátek | Cílový druh (Skot) |
| Diagnostická citlivost(oproti SICCT) | N | 344 |
| DSn | (69,5 %) |
| CI | (64,4 % - 74,1 %) |
|  |  |  |
| Diagnostická specificita(oproti SICCT) | N | 144 |
| DSp | (97,2 %) |
| CI | (92,8 % - 99,1 %) |

Srovnání výsledků M. bovis ELISA s pozitivními výsledky testu GIFN (test pomocí interferonu gama)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Hodnocená testovací metoda | IDEXX M. bovis – ELISA protilátek | Cílový druh (Skot) |
| Diagnostická senzitivita(oproti Gamma IFN) | N | 166 |
| DSn | (62,7 %) |
| CI | (64,4 % - 74,1 %) |
|  |  |  |
| Diagnostická specificita(oproti Gamma IFN) | N | S gama negativními vzorky z negativních stád nebylo provedeno přímé srovnání  |
| DSp |
| CI |

Shody a odchylky

 Testování na tuberkulózu (klasifikace založena na vizuální inspekci při porážce, relativní úspěšnost kultivace, rozdíly mezi buněčnou [GIFN and SICCT] a humorální imunitní odpovědí) přineslo podle očekávání značný počet rozporných výsledků. Tyto rozpory ilustrují komplexní podstatu bovinní TBC a zdůrazňují význam uplatňování více různých diagnostických metod pro lepší porozumění této infekci. I přes významné odchylky mezi jednotlivými metodami data ukazují zvýšenou citlivost, které lze využít strategickým použitím testu na protilátky (zachycení podskupin skutečně pozitivních zvířat nezachycených jinými metodami).

Reprodukovatelnost

Pro stanovení reprodukovatelnosti na úrovni koncového uživatele byly dvěma laboratořím poskytnuty soubory popsaných vzorků (n=30) a rozdílné šarže testovacích sad. Každá laboratoř otestovala celý soubor vzorků (dvojitě, bez supervize) pomocí tří poskytnutých šarží testu.

Soubor vzorků byl tvořen celkem 30 vzorky (10 negativních a 20 pozitivních). Mezi šaržemi testovacích sad byla na všech třech testovacích pracovištích (včetně testování v laboratořích IDEXX) zaznamenána 100% shoda.

Reference

1. de la Rua-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton- Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Sci. 81:190-210.

2. Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. The Veterinary Record. 162: 382-384.

3. Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T. McGill, K., Collins, J.D. 2006. Vet. Microbiol. 112, 171-179.

4. Palmer, M. V., Waters, W. R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. Vet. Microbiol. 112, 181-190.

**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: 5A65.20

IDEXX a Test With Confidence jsou obchodní značky nebo registrované ochranné známky společnosti IDEXX Laboratories, Inc nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech a/nebo jiných zemích.

©2015 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**Upozornění**

H319 / P280 / P337+P313
**Roztok k ředění vzorků** − Způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné brýle. Přetrvá-li podráždění očí, poraďte se s lékařem/navštivte lékaře.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313
**TMB Substrát** − Způsobuje podrážení pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Noste ochranné rukavice/brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: poraďte se s lékařem/navštivte lékaře. Přetrvá-li podráždění očí, poraďte se s lékařem/navštivte lékaře.

H316 / H317 / P333+P313 / P363
**Zastavovací roztok**- Způsobuje podráždění pokožky. Může způsobit alergickou kožní reakci. Dojde-li k podráždění pokožky/výskytu vyrážky: poraďte se s lékařem/navštivte lékaře. Kontaminovaný oděv před novým použitím vyperte.

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

*Text na etiketu:*

Číslo schválení ÚSkVBL: 127-17/C

**IDEXX M.bovis**

**Testovací sada na průkaz protilátek proti Mycobacterium Bovis**

Distributor V ČR:

Cymedica spol. s r.o., Pod Nádražím 853, 268 01 Hořovice, ČR

Skladujte při teplotě 2–8 °C

Č.šarže a exspirace: viz.obal