cattletype MAP Ab Příručka

Pro detekci protilátek proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

 5 destiček (kat.č. CT270803)

 20 destiček (kat.č. CT270805)\*

INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig, Germany

\* dostupný na základě žádosti

Obsah

[Obsah soupravy 3](#_TOC_250024)

[Účel použití 3](#_TOC_250023)

[Symboly 4](#_TOC_250022)

[Kontrola kvality 4](#_TOC_250021)

[Skladování 5](#_TOC_250020)

[Bezpečnostní informace 5](#_TOC_250019)

[Úvod 6](#_TOC_250018)

[Princip 6](#_TOC_250017)

[Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem 7](#_TOC_250016)

[Důležitá upozornění 8](#_TOC_250015)

[Všeobecná upozornění 8](#_TOC_250014)

[Protokol: ELISA testovací procedura 9](#_TOC_250013)

[Důležité body před spuštěním 9](#_TOC_250012)

[Co je třeba udělat před zahájením testu 9](#_TOC_250011)

[Příprava vzorků mléka 9](#_TOC_250010)

[Testování v případě séra a vzorků plazmy 10](#_TOC_250009)

[Testování v případě vzorků mléka 11](#_TOC_250008)

[Interpretace dat 1](#_TOC_250007)2

[Validační kritéria 1](#_TOC_250006)2

[Výpočet 1](#_TOC_250005)2

[Interpretace výsledků 1](#_TOC_250004)3

[Interpretace výsledků pro sérum a vzorky plazmy 1](#_TOC_250003)3

[Interpretace výsledků pro vzorky mléka 1](#_TOC_250002)3

[Index změn 1](#_TOC_250001)5

[Rychlý průvodce pro cattletype MAP Ab 1](#_TOC_250000)6

# Obsah soupravy

cattletype MAP Ab Kat. č.

Počet destiček

Test. destička: mikrotitrační s 96 jamkami, potažená neinfekčním MAP antigenem

5

20

(5) CT270803 5

(20) CT270805\* 20

Ředící roztok vzorku, připraven k použití 1 x 100 ml 1 x 400 ml

Negativní kontrola, připravena k použití 1 x 3.5 ml 2 x 3.5 ml

Pozitivní kontrola, připravena k použití 1 x 3.5 ml 2 x 3.5 ml

Promývací pufr, 10x koncentrovaný 3 x 125 ml 2 x 500 ml

Konjugát, připraven k použití 1 x 60 ml 1 x 240 ml

TMB Substrát, připraven 1 x 60 ml 1 x 240 ml

Stop roztok, připraven k použití 1 x 60 ml 1 x 240 ml

Příručka 1 1

\* dostupný na základě žádosti

# Účel použití

Souprava *cattletype* MAP Ab je nepřímý ELISA test pro detekci protilátek k *Mycobacterium avium* subsp*. Paratuberculosis* (MAP) v séru, plazmě a vzorcích mléka skotu, ovcí a koz.

Souprava je schválena institutem Friedrich-Loeffler-Institut a registrována v souladu s § 11 (2) německého zákona o zvířecích chorobách (FLI-B 471) pro použití v Německu pro veterinární diagnostické postupy.

Pouze pro veterinární použití.

# Symboly

Zákonný výrobce

 Číslo šarže

  Spotřebujte do

 Teplotní omezení při skladování

 Příručka

 Katalogové číslo Číslo materiálu



 Pro vzorky skotu, ovcí a koz

# Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti ISO certifikovaných společností ISO je každá šarže *cattletype* MAP Ab testována na základě předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

# Skladování

Komponenty soupravy *cattletype* MAP Ab ELISA je třeba skladovat při teplotě 2–8 °C a zůstávají stabilní do data spotřeby uvedeného na štítku. Promývací pufr (10x) a stop roztok lze skladovat při pokojové teplotě (18–25 °C), aby nedocházelo ke krystalizaci soli. Pokud jsou součástí soupravy testovací stripy, zbylé testovací stripy skladujte do dalšího použití v těsně uzavřeném fóliovém váčku se sikativem při teplotě 2–8 °C. Testovací stripy je po otevření váčku s destičkou možné skladovat minimálně 6 týdnů.

# Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Tyto informace získáte od místního obchodního zástupce nebo e-mailem na adrese compliance@indical.com.

UPOZORNĚNÍ: Stop roztok obsahuje 0,5M kyselinu sírovou.

Všechny zbytky vzorků a předměty, které se dostaly do kontaktu se vzorky, je nutné dekontaminovat nebo zlikvidovat jako potenciálně infekční materiál.

# Úvod

Souprava *cattletype* MAP Ab je vysoce citlivé řešení pro detekci protilátek proti *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* (MAP).

MAP je příčinným činitelem pro paratuberkulózu, jinak zvanou také Johnova choroba. Paratuberkulóza je nevyléčitelné a chronické infekční onemocnění s dlouhou dobou inkubace, charakterizované nadměrnou ztrátou hmotnosti a s přetrvávajícím průjmem v konečné fázi u skotu. MAP je celosvětově rozšířen u přežvýkavců. Souprava *cattletype* MAP Ab umožňuje semikvantitativní detekci anti-MAP protilátek a může být použita se sérem, plazmou a vzorky mléka.

# Princip

Vzorky jsou nejprve zředěny a poté pre-inkubovány s ředícím roztokem, který obsahuje inaktivovaný *Mycobacterium phlei* extrakt, aby se minimalizovaly křížové reakce na atypické mykobakterie. Mikrotitrační destička je potažena MAP-antigenem. Během inkubace vzorku se MAP-specifické protilátky váží na imobilizovaný antigen. Nevázaný materiál se odstraní oplachováním. Konjugát anti-Ig-GHRP detekuje protilátky vázané na antigen. Nevázaný konjugát se odstraní oplachováním. Kolorimetrická reakce je zahájena přidáním roztoku substrátu a zastaví se po 10 minutách. V přítomnosti MAP-specifických protilátek ve vzorku HRP katalyzuje vývoj modré barvy, která je po přidání Stop roztoku žlutá. Optická denzita (OD) se měří spektrofotometrem. Hodnoty OD korelují s koncentrací protilátek anti-MAP ve vzorku.

# Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem

Při práci s chemikáliemi mějte vždy oblečený vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Více informací se dočtete v příslušných bezpečnostních listech (BL), které jsou k dispozici u dodavatele produktu.

 Kádinky

 Odměrné válce

 Pipety (nastavitelné)

 Multikanálové pipety (nastavitelné)

 Hliníková nebo adhezivní folie pro zakrytí testovací destičky

 Promývačka (volitelné)

 Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky

 Zkumavky a destičky pro naředění vzorků

 Destilovaná voda

# Důležitá upozornění

## Všeobecná opatření

Uživatel by vždy měl dbát následujících opatření:

 Při provádění testu nevystavujte TMB substrátový roztok intenzivnímu světlu ani slunečnímu světlu.

 Nesmí dojít ke kontaminaci komponentů testovací soupravy ani k jejich smíchání s komponenty z jiných šarží.

 Komponenty testovací soupravy nepoužívejte, pokud již uplynulo datum spotřeby.

 Nedostatečně čistá voda ze systémů s iontovou výměnou použitá k ředění promývacího pufru (10x) může test narušit. Použijte dvojitě destilovanou vodu nebo vysoce purifikovanou vodu (např. Milli-Q).

 Aby byly výsledky testu přesné, je nezbytné při provádění testu použít čisté nádobí a při pipetování a výplachu postupovat opatrně a striktně dodržovat inkubační doby.

# Protokol: ELISA testovací procedura

## Důležité body před spuštěním

* Prosím přečtěte si „Důležitá upozornění“ na straně 8 před spuštěním.

## Co je třeba udělat před zahájením testu

* Bezprostředně před použitím vytemperujte reagencie na pokojovou teplotu (18–25 °C). V případě, že se v promývacím pufru (10x) vyskytnou precipitované krystaly soli, rozpusťte je jemným vířením a zahříváním.
* Nařeďte promývací pufr (10x) 1:10 v destilované vodě. Například pro jednu testovací destičku nařeďte 25 ml promývacího pufru (10x) ve 225 ml destilované vody a promíchejte.
* Sérum/vzorky plazmy: Před analýzou vzorky séra/plazmy nařeďte v poměru 1:20v ředícím roztoku vzorku (např. nařeďte 10 μl vzorku v 190 μl ředícím roztoku vzorku) a dobře zamíchejte. Pro ředění používejte plastové zkumavky a nepotažené mikrotitrační destičky. Pro každý vzorek měňte pipetovací špičku.
* Kontroly jsou připraveny k použití a nevyžadují ředění.

## Příprava vzorků mléka

Před analýzou musí být vzorky mléka odtučněné. Centrifugujte vzorky plnotučného mléka 10 minut při nastavení 3000 x g a 10 °C nebo nechte vzorky uchované přes noc při teplotě 2-8 °C a poté odeberte oddělený tuk.

Vzorky mléka odeberte zpod vrstvy tuku. Pokud je to nutné, použijte jiný typ špiček pro průnik vrstvy tuku a pro odběr samotného vzorku. Vyvarujte se přenosu tuku do jamek mikrotitračních destiček, což může způsobit nespecifické reakce.

Zřeďte odtučněné **mléko 1:2** s ředícím roztokem, např. nařeďte 70 μl vzorku v 70 μl ředícího vzorku a dobře promíchejte. Vyměňte špičky pro každý vzorek.

## Testování v případě séra a vzorků plazmy

Přečtěte si „Co je třeba udělat před zahájením testu“, strana 9.

Postup

1. Proveďte pre-inkubaci naředěných vzorků po dobu 1-2 h při pokojové teplotě nebo přes noc (12-18 hodin) při teplotě 2-8 °C.

Uzavřete plastové zkumavky a zakryjte pre-inkubovanou destičku (víkem nebo lepící folií).

1. Napipetujte 100 μl negativní kontroly (v duplikátu) a pozitivní kontroly (v duplikátu) do příslušných jamek.
2. Napipetujte 100 μl pre-inkubovaného vzorku do zbývajících jamek a promíchejte.

Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků v protokolu testu. Pro přenos vzorků se doporučuje použití vícekanálové pipety. Zakryjte testovací destičku.

1. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).
2. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
3. Promyjte každou jamku 3x s 300 μl připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
4. Pipetujte 100 μl předpřipraveného konjugátu do každé jamky a inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě (18– 25°C). Zakryjte testovací destičku.
5. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
6. Promyjte každou jamku 3x s 300 μl připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
7. Pipetujte 100 μl roztoku TMB substrátu do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Odpočítávání začněte poté co je naplněna první jamka.
9. Zastavte reakci přidáním 100 μl Stop roztoku do každé jamky. Přidávejte Stop roztok v tom samém pořadí, v jakém jste přidávali roztok substrátu.
10. Změřte OD v destičkovém spektrofotometru při 450 nm během 20 min po zastavení reakce.

Měření při referenční vlnové délce (620-650 nm) je volitelné.

## Testování v případě vzorků mléka

Přečtěte si „Co je třeba udělat před zahájením testu“, strana 9.

Postup

1. Proveďte pre-inkubaci naředěných vzorků po dobu 1-2 h při pokojové teplotě.

Uzavřete plastové zkumavky a zakryjte pre-inkubovanou destičku (víkem nebo lepící folií).

1. Napipetujte 50 μl naředěného vzorku do 4 testovacích jamek. Napipetujte 50 μl negativní a pozitivní kontroly v duplikátu do předem určených jamek a dobře promíchejte.
2. Napipetujte 100 μl pre-inkubovaného vzorku do zbývajících jamek a promíchejte.

Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků v protokolu testu. Pro přenos vzorků se doporučuje použití vícekanálové pipety. Zakryjte testovací destičku.

1. Inkubujte přes noc při teplotě 2-8 °C.
2. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
3. Promyjte každou jamku 3x s 300 μl připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
4. Pipetujte 100 μl předpřipraveného konjugátu do každé jamky a inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě (18–25 °C).

Zakryjte testovací destičku.

1. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
2. Promyjte každou jamku 3x s 300 μl připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
3. Pipetujte 100 μl roztoku TMB substrátu do každé jamky.
4. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě.

Odpočítávání začněte poté co je naplněna první jamka.

1. Zastavte reakci přidáním 100 μl Stop roztoku do každé jamky. Přidávejte Stop roztok v tom samém pořadí, v jakém jste přidávali roztok substrátu.
2. Změřte OD v destičkovém spektrofotometru při 450 nm během 20 min po zastavení reakce.

Měření při referenční vlnové délce (620-650 nm) je volitelné.

# Interpretace dat

## Validační kritéria

Výsledky jsou platné, pokud jsou dodrženy následující podmínky:

* Průměrná hodnota (MV) naměřené OD pro pozitivní kontrolu (PC) musí být ≥ 0,7
* MV naměřené OD pro negativní kontrolu (NC) musí být ≤ 0,2

V případě neplatných testů by měl být test proveden po důkladném přezkoumání návodu k použití.

## Výpočet

Vypočítejte MV naměřených OD pro negativní kontrolu (NC) a pozitivní kontrolu (PC).

Poměr (S/P) vzorku OD k průměru OD pozitivní kontroly se vypočítá podle následující rovnice:

ODsample – MV ODNC

MV ODPC– MV ODNC

S/P =

# Interpretace výsledků

Interpretace výsledků pro sérum a plazmu

* Vzorky s poměrem S/P < 0,4 jsou negativní.

Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* nemohly být detekovány.

* Vzorky s poměrem S/P ≥ 0,4 jsou pozitivní.

Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* byly detekovány.

## Interpretace výsledků pro mléko

* Vzorky s poměrem S/P < 0,6 jsou negativní.

Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* nemohly být detekovány.

* Vzorky s poměrem S/P ≥ 0,6 jsou pozitivní.

Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* byly detekovány.

INDICAL nabízí řadu souprav ELISA a real-time PCR a real-time RT-PCR souprav pro detekci živočišných patogenů.

Navštivte www.indical.com, kde naleznete další informace o produktech baktotyp, cador, cattletype, flocktype, pigtype a virotype.

Aktualizované informace o licencích a odmítnutí odpovědnosti za konkrétní produkt naleznete v příslušné příručce k soupravě INDICAL nebo uživatelské příručce.

 Poznámky

Index změn

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Příručka | Verze | Změna |
| HB-1615-EN-005 | Červen 2018 | INDICAL design |

# Rychlý průvodce cattletype MAP Ab

### Ředění vzorku:

Sérum, plazma 1:20, dobře promíchejte

Mléko 1:2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Krok | Sérum, Plazma | Mléko |
| 1. Pre-inkubace | 1-2 h pokojová teplota nebo 2-8 °C přes noc | 1-2 h pokojová teplota |
| 2. Transfer |  100 µl/jamka |  |
| 3. Inkubace | 30 min při pok. teplotě |  přes noc 2-8 °C |
| 4. Promytí | 3 x 300 µl |  |
| 5. Konjugát | 100 µl/jamka |  |
| 6. Inkubace |  30 min při pok. teplotě |  |
| 7. Promytí | 3 x 300 µl |  |
| 8. TMB | 100 µl/jamka |  |
| 9. Inkubace | 10 min při pok. teplotě |  |
| 10. Stop | 100 µl/jamka |  |
| 11. Čtení | 450 nm |  |

Interpretace dat

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Vzorek | Negativní | Pozitivní |
| Sérum, plazma | S/P < 0,4 | S/P ≥ 0,4 |
| Mléko | S/P < 0,6 | S/P ≥ 0,6 |

Objednávky: [www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact) Technická podpora: support@indical.com

Web: [www.indical.com](http://www.indical.com)