# Obecné informace

Tato diagnostická souprava je určena k detekci specifických protilátek proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Jako vzorky je možné zpracovat sérum nebo plazmu koz, ovcí, skotu a buvolů nebo hovězí mléko (individuální i směsné vzorky mléka).

Tento dokument popisuje návod k použití pro vzorky séra nebo plazmy. Pro zpracování vzorků mléka přejděte na přiložený protokol pro vzorky mléka (Protokol 2/2).

Popis a princip

Metoda použitá v této soupravě je popsána v doporučeních OIE (Příručka doporučených diagnostických technik a požadavků, svazek III – Paratuberkulóza 5B/009).

Mikrodestičky jsou potaženy purifikovaným antigenem *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP).

Pokud je nutno zabránit zkříženým reakcím, inkubujte vzorky před přenosem na potažené mikrodestičky v neutralizačním pufru obsahujícím antigen *Mycobacterium phlei* (ředící pufr 6).

Protilátky anti-MAP-IgG přítomné ve vzorku tvoří s antigeny MAP komplex protilátka-antigen.

Do jamek mikrodestičky se přidá naředěný konjugát označený křenovou peroxidázou (HRP). Ten se naváže na protilátky anti-MAP a vytvoří konjugovaný komplex antigen-protilátka-konjugát-HRP, který je následně detekován čtecím zařízením ELISA.

Po vymytí přebytečného konjugátu se přidá roztok substrátu (TMB). Výsledné zbarvení jamek závisí na množství specifických protilátek přítomných v testovaném vzorku.

- V přítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.

- V nepřítomnosti protilátek se neobjeví žádné zbarvení.

Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 450 nm.

Součásti soupravy

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným antigenem MAP |
| Koncentrovaný konjugát (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 6 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

\* *Dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy.*

1. Ředící pufr 6, konjugát, kontroly a roztok substrátu musí být skladovány při teplotě 5 °C (± 3 °C).

2. Ostatní činidla lze skladovat při teplotě +2 °C až +26°C.

3. Podrobné informace o podmínkách skladování otevřených a/nebo neotevřených součástí soupravy naleznete na: https://www.id- vet.com/fr/support/faq.

4. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou řadu výrobků ID.Vet. Substrátové roztoky a ředící pufry se stejnými čísly šarží jsou zaměnitelné.

Požadované materiály, které nejsou součástí balení

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro dávkování 10 μl, 100 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatický promývací systém.
6. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

Bezpečnostní opatření

1. Nepipetujte ústy.

2. Obsahuje složky, které mohou být škodlivé pro pokožku i oči a při kontaktu mohou způsobit podráždění. Pracujte tak, aby nedocházelo ke kontaktu s pokožkou a očima. Používejte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Stop roztok (0,5 M) může být při požití škodlivý.

3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.

4. Veškerý odpad by měl být před likvidací řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání nebo na adrese info@innovativediagnostics.com.

5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

Příprava promývacího roztoku

Pokud je to nutné, nechejte promývací koncentrovaný roztok (20x) po vyjmutí z chladničky pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a důkladně promíchejte, aby se zajistilo, že promývací koncentrát je zcela homogenní. Připravte si pracovní promývací roztok (1x) zředěním promývacího koncentrátu (20x) v destilované nebo deionizované vodě v poměru 1:20.

Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Dbejte na to, aby byly jamky mezi promývacími kroky zcela prázdné. Pokud používáte automatickou promývací stanici, zkontrolujte si správné nastavení funkčních parametrů promývací stanice (režim, typ aspirace, výška aspirace). Další informace naleznete v příručce "IDvet Washing Guide", která je k dispozici na vyžádání.

Postup testování séra nebo plazmy

Pokud je to nutné, nechejte všechna činidla po vyjmutí z chladničky ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Všechna činidla důkladně promíchejte pomalým převrácením nebo kroužením.

1. V 96 jamkové mikrodestičce si předem nařeďte vzorky a kontroly v poměru 1:12 v ředícím pufru 6 následujícím postupem:

- 10 µl negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 10 µl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 10 µl testovaného vzorku do všech zbývajících jamek.

- 110 µl ředícího pufru 6 do všech jamek.

*Poznámka: Při dodržení výše popsaných poměrů je možné použít i větší objemy ředícího pufru 6 a vzorků (například 15 µl vzorku a 165 µl ředícího pufru 6 pro protokol se sérem). V případě potřeby může společnost Innovative Diagnostics dodat další ředící pufr 6.*

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 5 až 45 minut

při teplotě 21 °C (± 5 °C).

3. Přeneste 100 µl předem neutralizovaných vzorků a kontrol do jamek mikrotitrační destičky ELISA.

4. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C) (krátká inkubace) nebo přes noc (16 až 20 hodin) při teplotě 5 °C (± 3 °C).

5. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 µl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

6. Připravte si pracovní roztok konjugátu zředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 (pokud používáte postup krátké inkubace) nebo 1:25 (pokud používáte postup inkubace přes noc) v ředícím pufru 3.

7. Do každé jamky přidejte 100 µl pracovního roztoku konjugátu.

8. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 30 minut ± 3 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

9. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 µl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily

10. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku substrátu.

11. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 15 minut ± 2 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C) v temnu.

12. Do každé jamky přidejte 100 µl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 10, abyste zastavili reakci.

13. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

# Kontrola:

Test je platný, pokud:

* střední hodnota OD pozitivní kontroly

(ODPC) je vyšší než 0,350.



* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.



# Vyhodnocení:

Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

www.innovative-diagnostics.com - E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/P níže uvedeným způsobem s použitím korigovaných hodnot vzorku a kontroly:





Vzorky séra nebo plazmy u vzorků koz, ovcí a skotu při použití krátkého inkubačního protokolu nebo inkubačního protokolu přes noc:

Vzorky vykazující poměr S/P:

* nižší nebo roven 60 %, se považují za **negativní**.
* vyšší než 60 % a nižší než 70 % jsou považovány za **hraniční**.
* vyšší nebo roven 70 % se považují za **pozitivní**.

**Vzorky séra nebo plazmy**

(Vzorky mléka viz protokol 2/2)

**Protokol s krátkou inkubací**

**nebo protokol s inkubací přes noc**

Pouze pro použití *in vitro*

Pouze pro veterinární použití

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

**Poznámka**:

K dispozici je program pro analýzu dat IDSoft zdarma. Pro více informací se obraťte na email oddělení technické podpory: support.software@innovative-diagnostics.com

Tento program vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry, věk, skupiny), dále nabízí grafické znázornění a sérologické profily testovaných zvířat.



Obecné informace

Tato diagnostická souprava je určena k detekci specifických protilátek proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Jako vzorky je možné zpracovat sérum nebo plazmu koz, ovcí, skotu a buvolů nebo hovězí mléko (individuální i směsné vzorky mléka).

Tento dokument popisuje návod k použití pro vzorky mléka. Pro zpracování vzorků séra nebo plazmy přejděte na přiložený protokol pro vzorky séra nebo plazmy (Protokol 1/2).

Popis a princip

Metoda použitá v této soupravě je popsána v doporučeních OIE (Příručka doporučených diagnostických technik a požadavků, svazek III – Paratuberkulóza 5B/009).

Mikrodestičky jsou potaženy purifikovaným antigenem *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP).

Pokud je nutno zabránit zkříženým reakcím, inkubujte vzorky před přenosem na potažené mikrodestičky v neutralizačním pufru obsahujícím antigen *Mycobacterium phlei* (ředící pufr 6).

Protilátky anti-MAP-IgG přítomné ve vzorku tvoří s antigeny MAP komplex protilátka-antigen.

Do jamek mikrodestičky se přidá naředěný konjugát označený křenovou peroxidázou (HRP). Ten se naváže na protilátky anti-MAP a vytvoří konjugovaný komplex antigen-protilátka-konjugát-HRP, který je následně detekován čtecím zařízením ELISA.

Po vymytí přebytečného konjugátu se přidá roztok substrátu (TMB). Výsledné zbarvení jamek závisí na množství specifických protilátek přítomných v testovaném vzorku:

- V přítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.

- V nepřítomnosti protilátek se neobjeví žádné zbarvení.

**Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 450 nm.**

Součásti soupravy

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným antigenem MAP |
| Koncentrovaný konjugát (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 6 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

\* *Dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy.*

1. Ředící pufr 6, konjugát, kontroly a roztok substrátu musí být skladovány při teplotě 5 °C (± 3 °C).

2. Ostatní činidla lze skladovat při teplotě +2 °C až +26°C.

3. Podrobné informace o podmínkách skladování otevřených a/nebo neotevřených součástí soupravy naleznete na: https://www.id- vet.com/fr/support/faq.

4. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou řadu výrobků ID.Vet. Substrátové roztoky a ředící pufry se stejnými čísly šarží jsou zaměnitelné.

Požadované materiály, které nejsou součástí balením

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro dávkování 10 μl, 100 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatický promývací systém.
6. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

Bezpečnostní opatření

1. Nepipetujte ústy.

2. Obsahuje složky, které mohou být škodlivé pro pokožku i oči a při kontaktu mohou způsobit podráždění. Pracujte tak, aby nedocházelo ke kontaktu s pokožkou a očima. Používejte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Stop roztok (0,5 M) může být při požití škodlivý.

3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.

4. Veškerý odpad by měl být před likvidací řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání nebo na adrese info@innovativediagnostics.com.

5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

Příprava promývacího roztoku

Pokud je to nutné, nechejte promývací koncentrovaný roztok (20x) po vyjmutí z chladničky pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a důkladně promíchejte, aby se zajistilo, že promývací koncentrát je zcela homogenní. Připravte si pracovní promývací roztok (1x) zředěním promývacího koncentrátu (20x) v destilované nebo deionizované vodě v poměru 1:20.

Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Dbejte na to, aby byly jamky mezi promývacími kroky zcela prázdné. Pokud používáte automatickou promývací stanici, zkontrolujte si správné nastavení funkčních parametrů promývací stanice (režim, typ aspirace, výška aspirace). Další informace naleznete v příručce "IDvet Washing Guide", která je k dispozici na vyžádání.

Postup testování jednotlivých nebo

hromadných vzorků mléka

Pokud je to nutné, nechejte všechna činidla po vyjmutí z chladničky ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Všechna činidla promíchejte pomalým převrácením nebo kroužením.

Každý vzorek mléka odstřeďte nebo nechte odstát tak, aby se smetana oddělila od laktoséra (smetana nahoře, laktosérum dole).

K analýze odeberte pouze laktosérum

(protilátky se nacházejí v laktoséru).

1. V 96 jamkové ředící mikrodestičce si předem nařeďte vzorky v ředícím pufru 6 v poměru 1:2 a kontroly v poměru 1:12. Přidejte:

- 10 µl negativní kontroly a 110 µl ředícího pufru 6

do jamek A1 a B1.

* + 10 µl pozitivní kontroly a 110 µl ředícího pufru 6

do jamek C1 a D1.

* + 80 µl ředícího pufru 6 a 80 µl testovaného vzorku

do všech zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 5 až 45 minut

při teplotě 21 °C (± 5 °C).

3. Přeneste 100 µl předem neutralizovaných vzorků

a kontrol do jamek mikrotitrační destičky ELISA.

4. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 45 minut ± 4 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C) (krátká inkubace) nebo přes noc

(16 až 20 hodin) při teplotě 5 °C (± 3 °C).

*5.* Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 µl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

*Dávejte pozor, aby v jamce po promytí nezůstal žádný tukový kroužek. Aby se zabránilo vzniku zbytků tuku, je možné mezi promývání zařadit dobu namáčení 2–5 minut a promývací krok vícekrát opakovat.*

6. Připravte si pracovní roztok konjugátu zředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 (pokud používáte postup krátké inkubace) nebo 1:25 (pokud používáte postup inkubace přes noc) v ředícím pufru 3.

7. Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu.

8. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 30 minut ± 3 minuty

 při teplotě 21 °C (± 5 °C).

9. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte nejméně 300 µl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

10. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku substrátu.

11. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte 15 minut ± 2 minuty

při teplotě 21 °C (± 5 °C) ve tmě.

12. Do každé jamky přidejte 100 µl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 10, abyste zastavili reakci.

13. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

# Kontrola:

Test je platný, pokud:

* střední hodnota pozitivní kontroly OD (ODPC) je vyšší než 0,350.



* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.



# Vyhodnocení:

Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

www.innovative-diagnostics.com - E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/P níže uvedeným způsobem s použitím korigovaných hodnot vzorku a kontroly:

 

# Jednotlivé vzorky mléka:

Vzorky vykazující poměr S/P:

* + nižší nebo roven 30 % se považují za **negativní**.
	+ vyšší než 30 % se považují za **pozitivní.**

**Vzorky mléka**

(Vzorky séra nebo plazmy viz protokol 1/2)

**Protokol s krátkou inkubací**

**nebo protokol s inkubací přes noc**

.

Pouze pro použití *in vitro*

Pouze pro veterinární použití

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

# Hromadné vzorky mléka:

Vzorky vykazující poměr S/P:

* nižší nebo roven 15 % se považují za **negativní**. Vyšší než 15 % se považují za **pozitivní.**

**Poznámka**:

K dispozici je program pro analýzu dat IDSoft zdarma. Pro více informací se obraťte na email oddělení technické podpory: support.software@innovative-diagnostics.com

Tento program vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry, věk očkování, skupiny) a nabízí grafické znázornění a sérologické profily testovaných zvířat.