

cattletype[®] MAP Ab

Příručka

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

Registrováno v souladu s § 11 (2) německého Zákona o zvířecích chorobách (FLI-B 471)



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
Účel použití	3
Symboly	4
Kontrola kvality	4
Skladování.....	5
Bezpečnostní informace	5
Úvod	6
Princip	6
Vybavení a reagensie zajištěné uživatelem	7
Důležitá upozornění	8
Všeobecná upozornění.....	8
Protokol: ELISA testovací procedura.....	9
Důležité body před spuštěním	9
Co je třeba udělat před zahájením testu.....	9
Příprava vzorků mléka	9
Testování v případě séra a vzorků plazmy	10
Testování v případě vzorků mléka.....	11
Interpretace dat.....	12
Validační kritéria.....	12
Výpočet	12
Interpretace výsledků	13
Interpretace výsledků pro sérum a vzorky plazmy	13
Interpretace výsledků pro vzorky mléka	13
Index změn	15
Rychlý průvodce pro cattletype MAP Ab	16

Obsah soupravy

cattletype MAP Ab	(5)	(20)
Kat. č.	CT270803	CT270805*
Počet destiček	5	20
Test. destička: mikrotitrační s 96 jamkami, potažená neinfekčním MAP antigenem	5	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 dobytka, 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 dobytka, ovcí a koz

Kontrola kvality

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

Storage

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 sikaivem 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-IgGHRP 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 densita (OD) se měří spektrofotometrem. Hodnoty OD korelují s koncentrací protilátek anti-MAP ve vzorku.

Vybavení a reagensie 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 byla výsledky testu přesné, je nezbytné při provádění testu použít čisté nádoby 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 reagentie na pokojovou teplotu (18–25 °C). V případě, že se v promývacím pufru (10x) vyskytnou precipitované krystaly soli, rozpusťte je jemným vířením a zahříváním.
- Nařed'te promývací pufr (10x) 1:10 v destilované vodě. Například pro jednu testovací destičku nařed'te 25 ml promývacího pufru (10x) ve 225 ml destilované vody a promíchejte.
- Sérum/vzorky plazmy: Před analýzou vzorky séra/plazmy nařed'te v poměru 1:20 v ředícím roztoku vzorku (např. nařed'te 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 smetanu.

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

Zřed'te odtučněné **mléko 1:2** s ředícím roztokem, např. nařed'te 70 μ l vzorku v 70 μ l ředícího vzorku a dobře promíchejte. Vyměňte špičky pro každý vzorek.

Testování v případě séra a vzorků plazmy

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

Postup

1. Proved'te pre-inkubaci naředěných vzorků po dobu 1-2h 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).
2. Napipetujte 100 μ l negativní kontroly (v duplikátu) a pozitivní kontroly (v duplikátu) do příslušných jamek.
3. Napipetujte 100 μ l 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.
4. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C).
5. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
6. Promyjte každou jamku 3x s 300 μ l připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
7. Pipetujte 100 μ l předpřipraveného konjugátu do každé jamky a inkubujte po dobu 30 min při pokojové teplotě (18–25°C). Zakryjte testovací destičku.
8. Odstraňte roztok ze všech jamek odsátím a vyklepáním.
9. Promyjte každou jamku 3x s 300 μ l připraveného promývacího roztoku. Po každém promytí odstraňte pufr.
10. Pipetujte 100 μ l roztoku TMB substrátu do každé jamky.
11. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Odpočítávání začněte poté co je naplněna první jamka.
12. Zastavte reakci přidáním 100 μ l Stop roztoku do každé jamky. Přidávejte Stop roztok v tom samém pořadí, v jakém jste přidávali roztok substrátu.

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

10. Pipetujte 100 μ l roztoku TMB substrátu do každé jamky.
11. Inkubujte po dobu 10 min při pokojové teplotě ve tmě.
Odpočítávání začněte poté co je naplněna první jamka.
12. Zastavte reakci přidáním 100 μ l Stop roztoku do každé jamky. Přidávejte Stop roztok v tom samém pořadí, v jakém jste přidávali roztok substrátu.
13. 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 $\geq 0,7$
- MV naměřené OD pro negativní kontrolu (NC) musí být $\leq 0,2$

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:

$$S/P = \frac{OD_{\text{sample}} - MV OD_{\text{NC}}}{MV OD_{\text{PC}} - MV OD_{\text{NC}}}$$

Interpretace výsledků

Interpretace výsledků pro sérum a plazmu

- Vzorok s poměrem S/P $<0,4$ jsou negativní.
Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nemohly být detekovány.
- Vzorok s poměrem S/P $\geq 0,4$ jsou pozitivní.
Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* byly detekovány.

Interpretace výsledků pro mléko

- Vzorok s poměrem S/P $<0,6$ jsou negativní.
Specifické protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nemohly být detekovány.
- Vzorok s poměrem S/P $\geq 0,6$ 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

Licenční smlouva s omezeným oprávněním pro cattletype MAPAb

Použití tohoto produktu znamená souhlas kupujícího nebo uživatele produktu s následujícími podmínkami:

1. Výrobek lze používat výhradně v souladu s protokoly dodanými s výrobkem a touto příručkou a pro použití s komponentami obsaženými v kitu. Společnost INDICAL neuděluje žádné oprávnění vyplývající z jakéhokoli svého duševního vlastnictví používat nebo zabudovat přiložené součásti této sady s jinými součástmi, které nejsou součástí této sady, s výjimkou popsaných v protokolech dodaných s tímto produktem, této příručky a dodatečných protokolů k dispozici na adrese www.indical.com.
Některé z těchto dodatečných protokolů byly poskytnuty společností INDICAL uživatelům INDICAL. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány nebo optimalizovány společností INDICAL. Společnost INDICAL za ně neručí a ani nezaručuje, že neporušují práva třetích stran
2. Kromě výslovně uvedených licencí společnost INDICAL neposkytuje žádnou záruku, že tato sada a / nebo její použití neporušují práva třetích stran.
3. Tato souprava a její složky jsou určeny k jednorázovému použití a je zakázáno je používat opakovaně, renovovat je či přeprodávat.
4. Společnost INDICAL výslovně odmítá jakékoliv jiné, výslovné nebo implicitní licence, než které jsou výslovně uvedeny
5. Kupující a uživatel této soupravy se dohodli, že sami nepodniknou, ani neumožní nikomu jinému podniknout, kroky, které by mohly vést k usnadnění kteréhokoli z výše uvedených typů jednání. Společnost INDICAL se může domáhat dodržování podmínek této omezené licenční smlouvy u kteréhokoli soudu a bude požadovat kompenzaci všech svých soudních výloh, výloh za vyšetřování, včetně poplatků za právníka, v případě jakéhokoli svého jednání s cílem domoci se svých práv duševního vlastnictví ve vztahu k této soupravě a/nebo jejím komponentům.

Aktuální licenční podmínky naleznete na stránkách www.indical.com.

Ochranné známky: bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Registrované názvy, ochranné známky apod. použité v tomto dokumentu, i když nemusí být výslovně takto označeny, je třeba považovat za chráněné zákonem.

HB-1615-EN-005 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, všechna práva vyhrazena.

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	1-2h pokojová teplota nebo 2-8°C přes noc	1-2h 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