



Mycobacterium paratuberculosis Antibody Test Kit

Kit pentru detectia anticorpilor contra *Mycobacterium paratuberculosis*

Kit pentru detectia anticorpilor anti-Mycobacterium paratuberculosis

Exclusiv de uz veterinar

Denumire și utilizare

IDEXX Paratuberculoză Screening este o tehnică imunoenzimatică pentru detectia anticorpilor anti-*Mycobacterium avium spp paratuberculosis* (MAP) în probe individuale de ser, plasmă și lapte de bovine și probe de ser și plasmă de la rumegătoare mici.

Informații generale

Paratuberculoza sau boala lui Johne este o enterită cronică a rumegătoarelor, ale cărei semne clinice sunt diarea și pierderea în greutate. Infecția este datorată unui bacil rezistent la acizi: *Mycobacterium paratuberculosis*. Unele animale sunt infectate în primul an de viață prin ingerarea alimentelor contaminate cu fecale de la alte animale infectate. Deoarece perioada de incubare poate fi de la câteva luni până la câțiva ani, boala nu se manifestă clinic până ce animalul devine adult. Nu există un tratament efectiv și animalul infectat moare din această boală. Metoda descrisă în acest kit este foarte asemănătoare cu aceea descrisă în recomandările 5B/009 (Manualul Tehnicilor de Diagnostic Recomandate și Cerințele pentru Produsele Biologice, volumul III – Paratuberculoza 5b/009, Paris: Organizația Mondială pentru Sănătate Animală, 1989-91). Antigenul căptușit pe fundul godeurilor este un extract protoplasmatic de *Mycobacterium paratuberculosis*. Probele sunt incubate mai întâi cu un extract de *Mycobacterium phlei* pentru a neutraliza orice reacții posibile de contaminare încrucișată cu mycobacterii atipice.

Acest kit este destinat detectiei anticorpilor împotriva *Mycobacterium avium spp paratuberculosis* în probe individuale de ser, plasmă și lapte de bovine, și probe individuale de ser și plasmă de rumegătoare mici.

Descriere și principiu

Microplăcile sunt căptușite cu antigen MAP. Probele de testat sunt pre-incubate cu extract de *Mycobacterium phlei* pentru a lega anticorpii nespecifici. Apoi probele sunt transferate și incubate în godeurile microplăcii căptușite. În timpul incubării probelor, anticorpii specifici MAP formează un complex imun antigen-anticorp pe suprafața godeurilor. După spălarea pentru eliminarea materialului nelegat, se adaugă conjugatul enzimatic, un anticorp anti-rumegătoare, care se leagă la orice complex imun antigen-anticorp. Conjugatul nelegat este eliminat prin spălare și se adaugă substratul enzimatic (TMB). În prezența enzimei, substratul este oxidat și dezvoltă un compus albastru care devine galben după blocare. Intensitatea culorii dezvoltate este direct proporțională cu cantitatea anticorpilor MAP prezenti în proba de testat. Relevanța diagnosticului rezultatului este obținută prin compararea densității optice a probei cu media densităților optice ale controlului pozitiv (vezi "Calcule" și „Interpretare și rezultate”).

Reagenți

Păstrați toti reagenții la 2-8°C.

Reagenți

		Volume
1	Plăci căptușite cu antigen MAP	5 10
2	Control pozitiv	0,5ml 2x 0,5ml
3	Control negativ	0,5ml 0,5ml
4a	Conjugat concentrat (anti-rumegătoare HRPO)	0,75ml 1,5ml
4b	Tampon de diluție N.1	120ml 120ml
5	Tampon de diluție N.12	100ml 2 x100ml
A	Substrat TMB N.9	60ml 120ml
B	Soluție de stopare N.3	60ml 120ml
C	Soluție de spălare concentrată (20x)	100ml 2x100ml

Notă: vezi tabelul de la pag.32 pentru descrierea simbolurilor internaționale utilizate pe etichetele din set.

Materiale necesare dar nefurnizate

- Microplăci necăptușite pentru pre-incubare
- Centrifugă (capacitate 2000xg)
- Micropipete de precizie și micropipete multicanal (volumele reagenților listăți în „Protocolul de testare” necesită precizie de $\pm 5\%$)
- Vârfuri de micropipetă
- Agitator de microplăci
- Apă distilată sau deionizată
- Spălător de microplăci (manual, semi-automat sau sistem automat)
- Capacă de plăci (folii adezive sau de aluminiu)
- Căitor de microplăci de 96 de godeuri echipat cu filtru de 450nm

Precauții și avertismente pentru utilizator

- Nu pipetați cu gura
- Purtați mănuși de protecție/echipament de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție
- Controalele, substratul și soluția de spălare concentrată pot provoca iritarea ochilor
- Soluția de stopare poate provoca arsuri severe ale pielii și ochilor
- Toate reziduurile trebuie decontaminate corespunzător înainte de eliminare. Aruncați conținutul în conformitate cu legislația locală, regională sau națională.

Prepararea reagenților

Soluția de spălare

Soluția de spălare concentrată (20x) trebuie diluată 1:20 cu apă distilată/deionizată înainte de utilizare (ex. 15ml soluție de spălare concentrată (20x) în 285 ml apă distilată). Această soluție va fi numită pe viitor „Soluție de spălare”.

Notă: Soluția de spălare concentrată (20x) trebuie adusă la 18-26°C și agitată pentru dizolvarea oricărora săruri precipitate. Soluția de spălare este stabila până la 3 zile păstrată la 2-8°C.

Conjugatul

Conjugatul concentrat poate fi:

- Diluat 1:100 în tamponul de diluție N.1 când se utilizează protocolul pentru incubarea scurtă a probelor
- Diluat 1:200 în tamponul de diluție N.1 când se utilizează protocolul pentru incubarea lungă a probelor

Notă: Soluția de conjugat diluat este stabilă până la 8 ore la 18-26°C.

Prepararea probelor

Probele și controalele sunt pre-diluate și pre-incubate într-o microplacă de prediluție necăptușită (vezi Protocolul de Testare).

Probele de lapte: poate fi folosit lapte degresat (obținut prin centrifugare) precum și lapte integral.

Procedeul de testare

Toți reagenții trebuie aduși la 18-26°C înainte de utilizare. Reagenții trebuie amestecați prin agitare ușoară sau vortexare. Utilizați vârfuri diferite pentru fiecare probă. Controalele pot fi distribuite oriunde în placă. Înregistrați poziția fiecărei probe pe foaia de lucru.

1. Diluați și pre-incubați probele și controalele în prezența *Mycobacterium phlei* într-o microplacă de prediluție necăptușită:
 - Diluați controlul negativ 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți într-un godeu
 - Diluați controlul pozitiv 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți într-un godeu
 - Probe de ser/plasmă: diluați probele 1:20 în tamponul de diluție N.12
 - Probe de lapte de bovine: diluați probele de lapte 1:2 în tamponul de diluție N.12
- Notă: Poate fi testat și lapte smântânit sau nesmântânit.
2. Omogenizați conținutul godeurilor de pre-diluție utilizând un agitator de microplăci.
3. Incubați timp de 15 minute până la 2 ore la 18-26°C.
4. Transferați 100µl din fiecare godeu în godeurile corespunzătoare din placa căptușită
5. Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci.
6. Acoperiți microplaca (cu un capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați timp de 45 de minute (± 5 min.) la 18-26°C sau peste noapte (16-24 ore) la 2-8°C.
7. Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 µl soluție de spălare de 3 ori. Aspirați conținutul lichid al godeurilor din toate godeurile după fiecare spălare. După ultima aspirație, bateți placă pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent. Notă: pentru probele de lapte, lăsați soluția de spălare timp de 2 minute în godeuri înainte de fiecare spălare pentru evitarea semnalului de fond.
8. Distribuiți 100µl conjugat în fiecare godeu.
9. Acoperiți microplaca (cu capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați timp de 30 de minute (± 3 min.) la 18-26°C.
10. Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300µl soluție de apălare de 3 ori. Aspirați conținutul lichid al godeurilor din toate godeurile după fiecare spălare. După ultima aspirație, bateți placă pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent.
11. Distribuiți 100µl substrat TMB N.9 în fiecare godeu.
12. Incubați 10 minute (± 3 min.) la 18-26°C la întuneric.
13. Distribuiți 100µl soluție de stopare N.3 în fiecare godeu. Agitați microplaca prin batere ușoară. Ștergeți cu grijă fundul microplăcii.
14. Citiți microplaca față de aer.
15. Măsurăți și înregistrați valorile densităților optice ale probelor și controalelor la 450nm.
16. Calculați rezultatele.

Notă: Când utilizați robotică, incubarea microplăcilor în camera de incubare permite testarea pe placă neacoperită. Utilizarea roboților nu este compatibilă cu agitarea ușoară sau ștergerea plăcilor. Plăcile pot fi ținute până la o oră în întuneric înainte de citire.

Rezultate

Pentru validarea încercării, media controlului pozitiv (CP_x) trebuie să fie mai mare sau egală cu 0,350.

În plus, raportul dintre media controlului pozitiv (CP_x) și controlul negativ (CNA_{450}) trebuie să fie mai mare sau egal cu 3,00.

NOTĂ: IDEXX deține instrumentul și soft-ware potrivit cu care se calculează mediile și valorile % și furnizează sumarul datelor.

Calcule

Calculați procentajul probă pe pozitiv (S/P) pentru fiecare probă. Pentru DO ale duplicatelor trebuie calculată media aritmetică.

Calculul pentru probele de testat

Procentajul S/P(%)

$$S/P(\%) = 100 \times \frac{ProbaA_{450} - CNA_{450}}{CPx - CNA_{450}}$$

Interpretarea rezultatelor

Ser și plasmă

- Probele cu S/P mai mic sau egal cu 45% sunt considerate **negative** la prezența anticorpilor MAP
- Probele cu S/P mai mare decât 45% și mai mic decât 55% sunt considerate **suspecte** și trebuie retestate
- Probele cu S/P mai mare sau egal cu 55% sunt considerate **pozitive** la prezența anticorpilor MAP.

Lapte de bovine

- Probele cu S/P mai mic sau egal cu 20% sunt considerate **negative** la prezența anticorpilor MAP
- Probele cu S/P mai mare decât 20% și mai mic decât 30% sunt considerate **suspecte** și trebuie retestate
- Probele cu S/P mai mare sau egal cu 30% sunt considerate **pozitive** la prezența anticorpilor MAP.

Sumarul procedurii de testare

IDEXX recomandă citirea cu atenție a instrucțiunilor înainte de utilizarea testului pentru prima dată.

Etape	Acțiune																
1. Preincubarea controalelor și probelor	<p>Diluați și pre-incubați probele și controalele în prezența <i>Mycobacterium phlei</i> într-o microplacă de prediluție necăptușită:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controalele: diluați controlul negativ 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți într-un godeu • Controalele: diluați controlul pozitiv 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți într-un godeu • Probe de ser/plasmă: diluați probele 1:20 în tamponul de diluție N.12 • Probe de lapte de bovine: diluați probele de lapte 1:2 în tamponul de diluție N.12 <p>Notă: Poate fi testat și lapte smântânit sau nesmântânit. Omogenizați conținutul godeurilor de pre-diluție utilizând un agitator de microplăci. Incubați timp de 15 minute până la 2 ore la 18-26°C.</p>																
2. Incubarea probelor	<p>Transferați 100µl din fiecare godeu în godeurile corespunzătoare din placă căptușită: Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci. Acoperiți microplaca (cu un capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați timp de 45 de minute (± 5 min.) la 18-26°C sau peste noapte (16-24 ore) la 2-8°C.</p>																
3. Spălarea plăcii	<p>Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 µl soluție de spălare de 3 ori. Aspirați conținutul lichid al godeurilor din toate godeurile după fiecare spălare. După ultima aspirație, bateți placă pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent. Notă: pentru probele de lapte, lăsați soluția de spălare timp de 2 minute în godeuri înainte de fiecare spălare pentru evitarea semnalului de fond.</p>																
4. Distribuirea conjugatului	Distribuiți 100µl conjugat în fiecare godeu.																
5. Incubarea conjugatului	Acoperiți microplaca (cu capac, folie de aluminiu sau folie adezivă) și incubați timp de 30 de minute (± 3 min.) la 18-26°C.																
6. Spălarea plăcii	<p>Spălați fiecare godeu cu aproximativ 300µl soluție de apălare de 3 ori. Aspirați conținutul lichid al godeurilor din toate godeurile după fiecare spălare. După ultima aspirație, bateți placă pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent</p>																
7. Distribuirea substratului	Distribuiți 100µl substrat TMB N.9 în fiecare godeu.																
8. Incubarea substratului	Incubați 10 minute (± 3 min.) la 18-26°C la întuneric																
9. Stoparea reacției	Distribuiți 100µl soluție de stopare N.3 în fiecare godeu. Agitați microplaca prin batere ușoară. Stergeți cu grijă fundul microplăcii.																
10. Măsurarea plăcii	Citiiți microplaca față de aer. Măsurăți și înregistrați valorile densităților optice ale probelor și controalelor la 450nm. Calculați rezultatele.																
11. Interpretarea (procentajul S/P)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Ser, plasmă</th> <th>$\leq 45\%$</th> <th>$> 45\% \text{ și } < 55\%$</th> <th>$\geq 55\%$</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Negativ</td> <td>Suspect</td> <td>Pozitiv</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Lapte de bovine</td> <td>$\leq 20\%$</td> <td>$> 20\% \text{ și } < 30\%$</td> <td>$\geq 30\%$</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Negativ</td> <td>Suspect</td> <td>Pozitiv</td> </tr> </tbody> </table>	Ser, plasmă	$\leq 45\%$	$> 45\% \text{ și } < 55\%$	$\geq 55\%$	Negativ	Suspect	Pozitiv		Lapte de bovine	$\leq 20\%$	$> 20\% \text{ și } < 30\%$	$\geq 30\%$		Negativ	Suspect	Pozitiv
Ser, plasmă	$\leq 45\%$	$> 45\% \text{ și } < 55\%$	$\geq 55\%$														
Negativ	Suspect	Pozitiv															
Lapte de bovine	$\leq 20\%$	$> 20\% \text{ și } < 30\%$	$\geq 30\%$														
	Negativ	Suspect	Pozitiv														

Produs de:

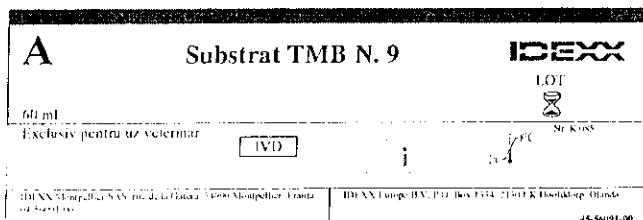
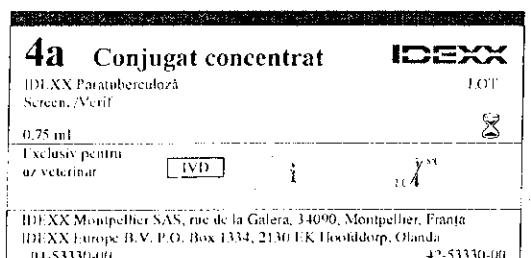
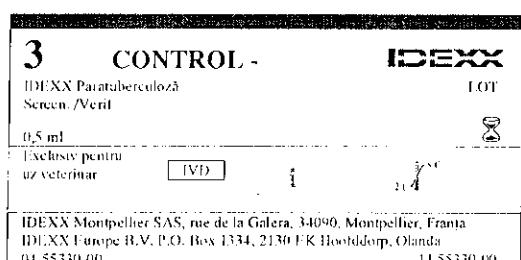
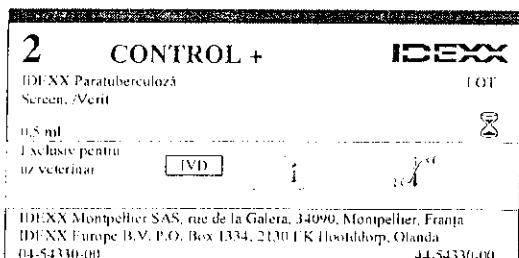
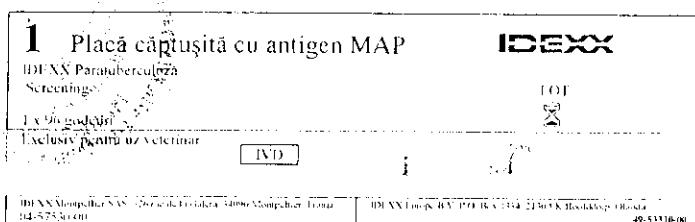
IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra – Parc Euromédiciné
34090 Montpellier, Franța

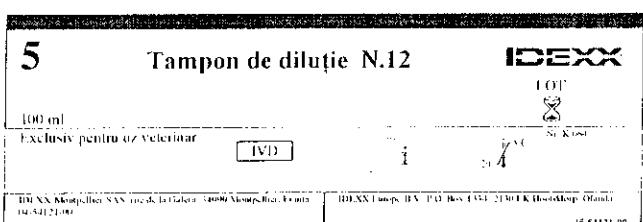
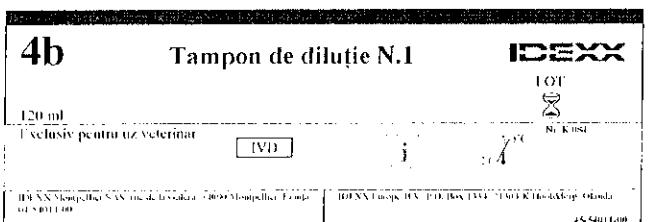
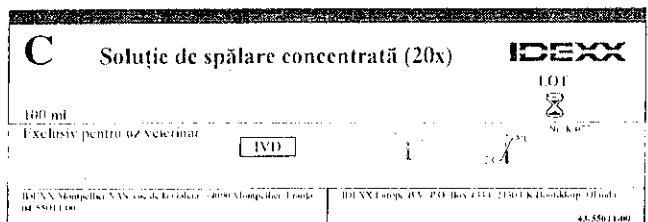
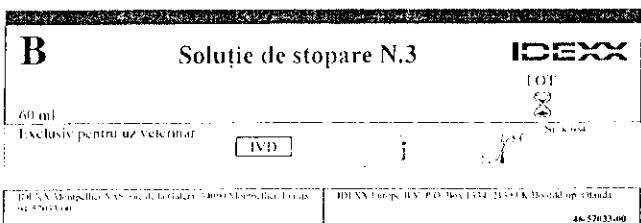
*IDEXX și Test With Confidence sunt marcă înregistrată a IDEXX Laboratories, Inc., sau a afiliatelor sale din Statele Unite și/sau alte țări.

Pentru asistență tehnică:

Contactați managerul sau distribuitorul IDEXX apropiat sau vizitați: www.idexx.com/production/contact
Suport tehnic IDEXX: 00-800-727-43399

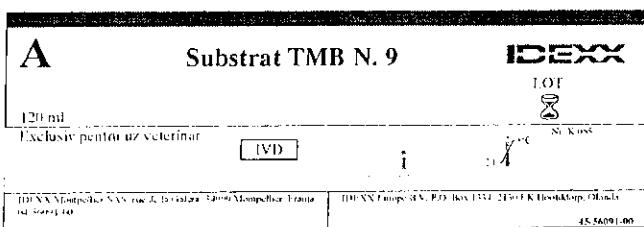
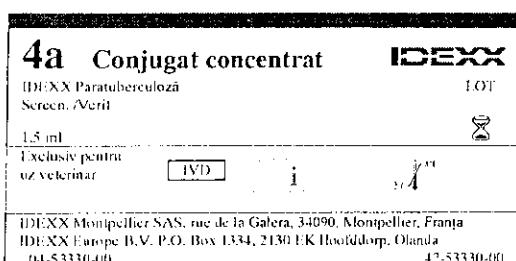
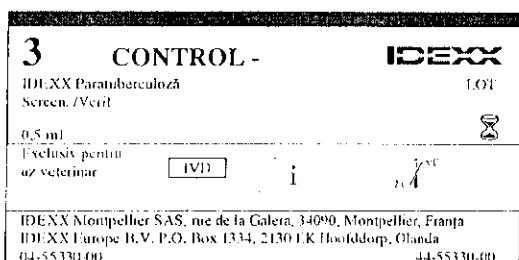
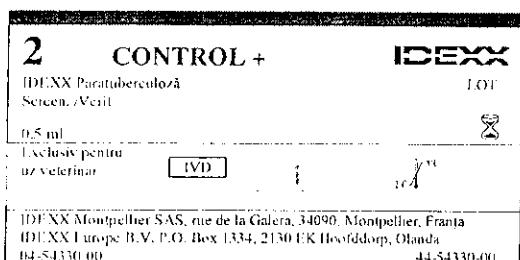
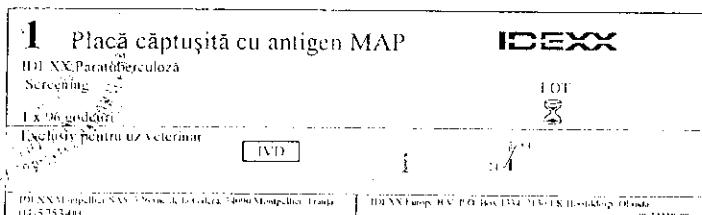
P07130-5
IDEXX Paratuberculoză Screening

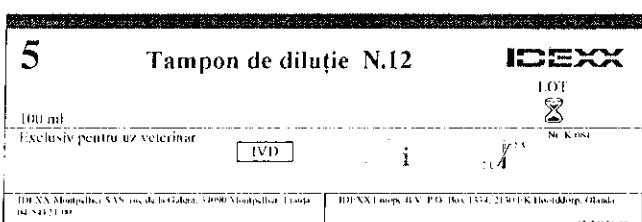
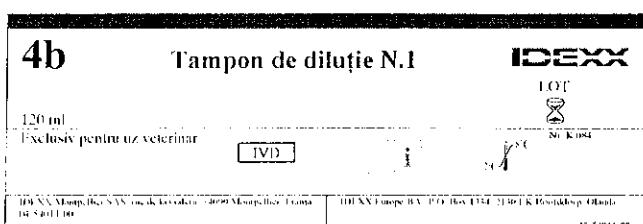
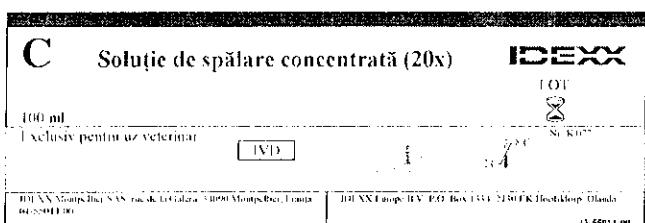
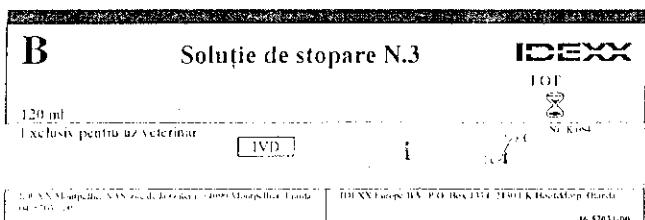




P07130-10

IDEXX Paratuberculoză Screening





IDEXX Paratuberculoză Screening

Kit detectie anticorpi
Mycobacterium
paratuberculosis

IDEXX Paratuberculoză Screening
5 x 96 godeuri

Lot: 1501

IDEXX Paratuberculoză Screening

Pentru utilizare cu seruri, plasmă și lapte de bovine și seruri și plasmă de la rumegătoare mici.

Notă: Pentru uz veterinar exclusiv.

Reagenți	Cantitatea
1. Plăci căptușite cu antigen MAP	5
2. Control pozitiv	1 x 0,5ml
3. Control negativ	1 x 0,5ml
4a. Conjugat concentrat	1 x 0,75ml
4b. Tampon de diluție N.1	1 x 120ml
5. Tampon de diluție N.12	1 x 100ml
A. Substrat TMB N.9	1 x 60ml
5. Soluție de stopare N.3	1 x 60ml
C. Soluție de spălare concentrată (20x)	1 x 100ml



IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra, 34090
Montpellier, Franta
Tel. +33 (0)4 99 23 24 25
Fax +33 (0)4 67 04 20 25



IDEXX Europa B.V.
PO Box. 1334, 2130 EK
Hoofddorp, Olanda
Tel. 00800-727-43399
Fax 00800-433-99329



2°C

8°C

04-57343 00

IDEXX Paratuberculoză Screening

Kit detecție anticorpi
Mycobacterium
paratuberculosis

IDEXX Paratuberculoză Screening
10 x 96 godeuri

IDEXX Paratuberculoză Screening

Pentru utilizare cu seruri, plasmă și lapte de bovine și seruri și plasmă de la rumegătoare mici.

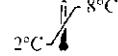
Notă: Pentru uz veterinar exclusiv

Reagenți	Cantitatea
1. Plăci căptușite cu antigen MAP	10
2. Control pozitiv	2 x 0,5ml
3. Control negativ	1 x 0,5ml
4a. Conjugat concentrat	1 x 1,5ml
4b. Tampon de diluție N.1	1 x 120ml
5. Tampon de diluție N.2	2 x 100ml
A. Substrat TMB N.9	1 x 120ml
5. Soluție de stopare N.3	1 x 120ml
C. Soluție de spălare concentrată (20x)	2 x 100ml



IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra, 34090
Montpellier, Franța
Tel. +33 (0)4 99 23 24 25
Fax +33 (0)4 67 04 20 25

EUROPE
IVD
IDEXX Europa B.V.
PO Box. 1334, 2130 EK
Hoofddorp, Olanda
Tel. 00800-727-43399
Fax 00800-433-99329



04.57343.00