



## ***Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit**

**Kit pentru detecția anticorpilor anti *Mycobacterium paratuberculosis***

IDEXX Paratuberculosis Screening  
Versiune : 06-07130-24

Test with confidence\*

**IDEXX**



## Kit pentru detecția anticorpilor anti-*Mycobacterium paratuberculosis*

Exclusiv de uz veterinar

### Denumire și utilizare

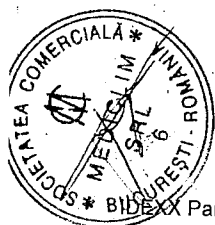
IDEXX Paratuberculoză Screening este o tehnică imunoenzimatică pentru detecția anticorpilor anti-*Mycobacterium avium* spp *paratuberculosis* (MAP) în probe individuale de ser, plasmă și lapte de bovine și probe de ser și plasmă de la rumegătoare mici.

### Informații generale

Paratuberculoza sau boala lui Johne este o enterită cronică a rumegătoarelor, ale cărei semne clinice sunt diareea și pierderea în greutate. Infecția este datorată unui bacil rezistent la acizi: *Mycobacterium paratuberculosis*. Uzual, 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 captușit 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.

### Descriere și principiu

Microplăcile sunt căptușite cu antigen MAP. Probele de testat sunt pre-incubate cu extract de *Mycobacterium phlei* pentru a lega anticorpii nespecfici. 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 prezenți în proba de testat. Rezultatul este obținut prin compararea densității optice a probei cu media densităților optice ale controlului pozitiv.



| Reagenți |                                      |          | Volume   |
|----------|--------------------------------------|----------|----------|
| 1        | Plăci căptușite cu antigen MAP       | 5        | 10       |
| 2        | Control pozitiv                      | 1x0,5ml  | 2x 0,5ml |
| 3        | Control negativ                      | 1x0,5ml  | 1x0,5ml  |
| 4a       | Conjugat concentrat                  | 1x0,75ml | 1x1,5ml  |
| 4b       | Tampon de diluție N.1                | 1x120ml  | 1x120ml  |
| 5        | Tampon de diluție N.12               | 1x100ml  | 2 x100ml |
| A        | Substrat TMB N.9                     | 1x60ml   | 1x120ml  |
| B        | Soluție de stopare N.3               | 1x60ml   | 1x120ml  |
| C        | Soluție de spălare concentrată (20x) | 1x100ml  | 2x100ml  |
|          |                                      |          | 30       |
|          |                                      |          | 3x1ml    |
|          |                                      |          | 3x1ml    |
|          |                                      |          | 3x1,5ml  |
|          |                                      |          | 3x120ml  |
|          |                                      |          | 5x100ml  |
|          |                                      |          | 3x120ml  |
|          |                                      |          | 3x120ml  |
|          |                                      |          | 6x100ml  |

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

### Stocare

Păstrați toți reagenții la 2-8°C. Reagenții sunt stabili până la data expirării, dacă sunt stocați corespunzător.

### Materiale necesare dar nefurnizate

- Micropipete de precizie și micropipete multicanal
- Vârfuri de micropipetă
- Cilindrii gradati pentru soluția de spălare
- Cititor de microplăci de 96 de godeuri (echipat cu filtru de 450nm)
- Spălător de microplăci (manual, semi-automat sau sistem automat)
- Utilizați doar apă distilată sau deionizată pentru prepararea reagenților utilizați în test
- Capace de plăci (folii adezive sau de aluminiu)
- Centrifugă (capacitate 2000xg)
- Vortex sau echivalent
- Agitator de microplăci
- Microplăci necăptușite pentru etapa de pre-incubare

### Precauții și avertismente pentru utilizatori

- Manipulați toate materialele biologice ca potențial infecțioase
- Purtați mănuși de protecție/echipament de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție când manipulați probele și reagenții
- Consultați fișa de securitate pentru mai multe informații
- Uitați-vă la sfârșitul instrucțiunilor pentru precauții și avertismente

### Practici de laborator

- Rezultate optime vor fi obținute prin respectarea strictă a acestui protocol. Pipetarea cu grijă, respectarea timpului și a metodei de spălare în timpul procedurii sunt necesare pentru menținerea preciziei și a acurateții. Utilizați vârfuri de micropipete separate pentru fiecare probă și ser martor.
- Nu expuneți soluția TMB la lumină puternică sau orice agent oxidant. Utilizați sticlărie curată sau recipiente din plastic la manevrarea TMB-ului.
- Toate deșeurile vor fi decontaminate corespunzător înainte de distrugere. Eliminarea deșeurilor să se facă în concordanță cu legislația locală, regională și națională.
- Lucrați cu grijă pentru a preveni contaminarea componentelor kitului. Nu puneți reagenții neutilizați înapoi în flacoane.
- Nu utilizați setul după data de expirare și nu amestecați componente ale seturilor din loturi diferite



## 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 oricăror săruri precipitate. Soluția de spălare este stabilă 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.

### Procedeu de testare

Toți reagenții trebuie aduși la 18-26°C înainte de utilizare. Reagenții trebuie amestecați prin agitare ușoară sau vortexare.

1. Înregistrați poziția fiecărei probe pe foaia de lucru.  
2. Diluați și pre-incubați probele și controalele în prezența *Mycobacterium phlei* într-o microplacă de prediluție necăptușită:

- diluați controlul negativ (CN) 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți într-un godeu
- diluați controlul pozitiv (CP) 1:20 în tamponul de diluție N.12 și distribuiți în două godeuri
- 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.

3. Omogenizați conținutul godeurilor de pre-diluție utilizând un agitator de microplăci.
4. Incubați timp de 15 minute până la 2 ore la 18-26°C.
5. Transferați 100μl din fiecare godeu în godeurile corespunzătoare din placa căptușită.
6. Omogenizați conținutul godeurilor utilizând un agitator de microplăci.
7. 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.
8. Aruncați soluția și spălați fiecare godeu cu aproximativ 300 μl soluție de spălare de 3-5 ori. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent. Bateți placa de fluidul rezidual din fiecare microplacă pe un material absorbant.

**Notă:** dacă testați probe de lapte smântânit (sau lapte luat de sub stratul de smântână), acest mod de spălare este suficient. Cu lapte gras, este indicat să se modifice metoda de spălare prin adăugarea unui pas de aspirare de 1 minut per ciclu de spălare. Acesta facilitează eliminarea particulelor de grăsime care se fixează într-un mod nespecific la conjugat în pasul următor. Spălarea cu conștiinciozitate este esențială pentru rezultate optime.



9. Distribuți 100μl conjugat în fiecare godeu.
10. Acoperiți microplaca și incubați timp de 30 de minute (±3 min.) la 18-26°C.
11. Aruncați soluția și spălați fiecare godeu cu aproximativ 300μl soluție de apălare de 3 ori. Evitați uscarea plăcii între spălări și înainte de adăugarea următorului reagent. După ultima aspirație, bateți placa pe un material absorbant pentru eliminarea lichidului rezidual.
12. Distribuți 100μl substrat TMB N.9 în fiecare godeu.
13. Incubați 10 minute (±3 min.) la 18-26°C evitând lumina directă.
14. Distribuți 100μl soluție de stopare N.3 în fiecare godeu
15. Măsurați și înregistrați valorile densităților optice ale probelor și controalelor la 450nm.

Notă: Când utilizați robotica, incubarea microplăcilor în camera de incubare permite testarea pe placa 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.

16. Calcule:

### Controale

$$CPx = \frac{CP1A_{450} + CP2A_{450}}{2}$$

### Criterii de validare

$$CPx \geq 0,350$$

$$CPx: CNA(450) \geq 3,00$$

Pentru încercări invalide, tehnica poate fi suspectă și încercarea trebuie repetată respectând instrucțiunile de utilizare. NOTĂ: IDEXX deține instrumentul și soft-ware potrivit cu care se calculează mediile și valorile % și furnizează sumarul datelor.

### Probe

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

### 17. Interpretarea

#### Ser și plasmă

Negative

$$S/P\% \leq 45\%$$

Suspecte

$$45\% < S/P\% < 55\%$$

Pozitive

$$S/P\% \geq 55\%$$

#### Lapte de bovine<sup>(1)</sup>

Negative

$$S/P\% \leq 20\%$$

Suspecte

$$20\% < S/P\% < 30\%$$

Pozitive

$$S/P\% \geq 30\%$$

**Notă:** <sup>(1)</sup> Următoarele reguli de interpretare sunt aplicabile pentru analiza probelor de lapte de bovine în Germania:

- Probele cu S/P mai mic sau egal cu 30% sunt considerate **negative** la prezența anticorpilor MAP
- Probele cu S/P mai mare decât 30% și mai mic decât 40% sunt considerate **suspecte** și trebuie retestate
- Probele cu S/P mai mare sau egal cu 40% sunt considerate **pozitive** la prezența anticorpilor MAP.



**Pentru asistența tehnică:**

IDEXX SUA Tel: + 1 800 548 9997 sau +1 207 556 4895

IDEXX EuropaTel: +800 727 43399

Contactați managerul local IDEXX sau distribuitorul sau vizitați [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)



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

© 2014 IDEXX Laboratories, Inc. Toate drepturile rezervate.