

SERELISA® M. ParaTB Ab Mono Indirect

**KIT PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI ANTI-
MYCOBACTERIUM AVIUM SUB. PARATUBERCULOSIS
IN CAMPIONI DI SIERO E DI PLASMA DEI RUMINANTI
(BOVINI, OVINI, CAPRINI) E NEL LATTE BOVINO
(INDIVIDUALE)**

TECNICA IMMUNOENZIMATICA INDIRECTA

384 reazioni a pozzetto singolo

I. PRINCIPIO DEL TEST

Il SERELISA® M. ParaTB Ab Mono Indirect kit utilizza una tecnica immunoenzimatica indiretta per la diagnosi di malattia di Johne's attraverso la rilevazione degli anticorpi del *Mycobacterium avium* sub. *Paratuberculosis* (M.paraTB) in campioni di sangue o di plasma dei ruminanti (bovini, ovini e caprini) e nel latte bovino. Onde evitare cross reazioni, i campioni da analizzare e i controlli vengono pre-diluiti in una soluzione diluente contenente *Mycobacterium phlei*.

La tecnica utilizzata in questo kit è descritta nelle **raccomandazioni dell'OIE** (Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements volume III – Paratuberculosis 5 B/009).

E' necessario eseguire tre passaggi:

1. Ogni campione pre-diluito viene messo in un pozzetto sensibilizzato con un antigene purificato di *Mycobacterium sp.* Gli anticorpi presenti nel campione si legano in modo specifico all'antigene adeso al pozzetto.
2. Dopo un lavaggio, si aggiunge un coniugato anti-specie con perossidasi. Si fissa alle immunoglobuline bovine (anticorpi) catturate in precedenza, formando un complesso:
(Ag) - (Ab anti-M.ParaTB) - (conj anti-species/ perossidasi).
3. L'eccesso di coniugato non legatosi, viene eliminato da un secondo lavaggio. L'enzima che si lega al complesso formatosi viene rivelato dall'aggiunta di un substrato che lo trasforma in un prodotto colorato. Le densità ottiche corrispondenti vengono lette ed interpretate usando un valore soglia ottenuto attraverso l'utilizzo del controllo positivo.

II. COMPOSIZIONE DEL KIT E CONSERVAZIONE

REAGENTI PURI	RICOSTITUZIONE E CONSERVAZIONE
4 micropiastre contengono 12 strip da 8 pozzetti sensibilizzati con antigene M. ParaTB	Usare entro 2 mesi dall'apertura della busta che deve essere richiusa dopo l'uso.
Coniugato anti-specie/ perossidasi (CJ) (concentrato)	Deve essere diluito nel CD 1/100 per l'incubazione con protocollo corto e 1/200 per quella con protocollo lungo (overnight). Usare entro 2 ore dopo la diluizione.
Tampone substrato perossidasi (ABTS)	Pronto all'uso.
Controllo Negativo (N)	Diluire 40 volte come 1 campioni di siero/plasma.
Controllo Positivo (P)	Diluire 40 volte come 1 campioni di siero/plasma.
Diluente campione, colore rosa (SD)	Pronto all'uso.
Soluzione lavaggio (W) (concentrata 20 volte)	Diluire 20 volte con acqua distillata o demineralizzata. Usare entro 5 giorni dalla preparazione.
Diluente coniugato, colore blu (CD)	Pronto all'uso.
Soluzione stoppante (S)	Pronto all'uso.
Pellicole adesive	12 films

Nota: Il kit e i reagenti diluiti dovrebbero essere conservati a +5 ± 3°C ed utilizzati come sopra descritto.

III. MATERIALI E REAGENTI RICHIESTI (NON FORNITI)

- Acqua distillata o demineralizzata.
- Pipette monocolanale a volume variabile o set di pipette in grado di misurare da 0 a 1000 µl. Il limite di tolleranza deve essere ≤ 10% per volumi ≤ 10 µl e ≤ 5% per tutti gli altri volumi.
- Cilindri graduati (100 ml e 1000 ml).
- Lavatore manuale, automatico o semi-automatico per lavaggio di micropiastre.
- Lettore di micropiastre, con filtri per lettura bicromatica a 450 e 630 nm. E' altresì possibile l'utilizzo di un lettore monocromatico dotato di filtro a 450 nm..

IV. AVVERTENZE

La qualità dei risultati dipende dal rispetto delle buone pratiche di laboratorio (vedi paragrafo VI).

1. Non mescolare o unire reagenti di kit con differente numero di lotto.
2. Non usare reattivi dopo la data di scadenza.
3. Portare tutti i reattivi a temperatura di laboratorio almeno 1 ora prima dell'uso. Attenzione: portare a temperature ambiente solo i reattivi che verranno usati.
4. Maneggiare tutti i reagenti ed i campioni come materiale pericoloso.
5. Tenere tutti i reattivi lontani dalla pelle e dagli occhi. Se dovesse accadere, lavare immediatamente con acqua fredda.
6. Non pipettare mai con la bocca.
7. Evitare la contaminazione del campione durante il prelievo, la conservazione o il trasporto. Cambiare il puntale della pipetta per ogni campione.
8. Evitare la contaminazione della soluzione tampone substrato con ioni metallo, con agenti ossidanti o con detersivi. Assicurarsi della perfetta pulizia dei vari recipienti. Non usare lo stesso recipiente o lo stesso puntale della pipetta per il coniugato e per il tampone substrato.
9. Si raccomanda di smaltire i reagenti e i materiali contaminati secondo le norme vigenti. Le schede di sicurezza per il prodotto sono disponibili su richiesta.

Segle di rischio e per la sicurezza:

R22: nocivo per ingestione.

R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle.

S26: In caso di contatto con gli occhi lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S30: Non versare acqua sul prodotto.

S36: Indossare indumenti protettivi adatti.

V. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il test è eseguibile su campioni di siero, di plasma di bovini, ovini e caprini e di latte bovino.

Il latte dovrebbe essere scremato prima del test (eseguire una decantazione overnight o una centrifugazione a basso numero di giri).

I campioni dovrebbero essere conservati secondo la seguente tabella:

Campioni	Freddo (+5°C)	Ghiaccio (-20°C)	Lab Temperatura (+23°C)
Siero, plasma individuali	max. 7 giorni	Si	No
Latte individuale	max. 5 giorni	Si	No

VI. PROCEDIMENTO

Eseguire esattamente quanto indicato nella sottostante metodica. Usare i controlli negativi e positivi in doppio per ogni sessione lavorativa e per ciascuna piastra.

A. PASSAGGI PRELIMINARI

Eseguire con la massima accuratezza la distribuzione e l'identificazione dei controlli e dei campioni.

Posizionare il controllo negativo (N) nei pozzetti A1 e A2 ed il controllo positivo (P) nei pozzetti B1 e B2.

B. TEST PROCEDURA

I - DILUIZIONE E DISTRIBUZIONE DEI CONTROLLI E DEI CAMPIONI

I controlli devono essere diluiti come i campioni di siero o di plasma.

• SIERI, PLASMA, CONTROLLI (diluizione 1:40):

I campioni, i controlli positivo (P) e negativo (N) devono essere pre-diluiti 1:10 (pre-assorbimento) in una piastra con micro pozzetti vuoti e poi ridiluiti 1:4:

1. Diluizione 1:10; dispensare in ogni pozzetto della piastra pre-diluizione 10 µl di campione e dei controlli, poi aggiungere 90 µl di diluente campione rosa (SD). Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore (la piastra con la pre-diluizione può essere conservata per 5 giorni a -20°C).

Incubare la piastra pre-diluizione a temperatura ambiente (+23 ± 5°C) per un periodo compreso tra 5 e 20 minuti.

2. Diluizione 1:4; mettere nei pozzetti sensibilizzati 75 µl di diluente campione rosa (SD) e trasferire 25 µl dei campioni e dei controlli precedentemente pre-diluiti. Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore.

• LATTE (diluizione 1:2),

I campioni di latte devono essere diluiti 1:2 con il diluente campioni rosa (SD). La diluizione dovrebbe essere fatta in provette vuote o in una piastra con micro pozzetti vuoti.

Incubare la piastra pre-diluizione a temperatura ambiente (+23 ± 5°C) per un periodo compreso tra 5 e 20 minuti.

- Mettere 100 µl di latte precedentemente pre diluito in ogni pozzetto.
- I campioni possono essere esaminate in singolo o in doppio.
- Le strisce dei micro pozzetti devono essere sempre montate sul telaio in modo da facilitare il lavaggio e la lettura dei campioni.
- Coprire i pozzetti con una pellicola adesiva, se possibile, tagliata della lunghezza necessaria a seconda del numero di strisce utilizzate.

Incubazione della piastra

- Protocollo con incubazione veloce: incubare 30 ± 5 min a temperatura ambiente (+23 ± 5°C), oppure
- Protocollo con incubazione lunga: overnight (14-18 ore) a +5 ± 3°C.

LAVAGGIO:

Preparare una quantità sufficiente di soluzione di lavaggio diluendo 1:20 la soluzione di lavaggio concentrata (W) con acqua distillata o demineralizzata.

Rimuovere delicatamente la pellicola adesiva e procedere al lavaggio per 6 volte.

II - AGGIUNTA DEL CONIUGATO

1. Preparazione del coniugato:

a) Per incubazione breve: Preparare la soluzione coniugato diluendo il coniugato concentrato (CJ) nel diluente coniugato blu (CD) alla diluizione **1:100** (2 ml sono necessari per 2 strisce; mettere **20 µl** di CJ in **1980 µl** di CD).

b) Per incubazione overnight: Preparare la soluzione coniugato diluendo il coniugato concentrato (CJ) nel diluente coniugato blu (CD) alla diluizione **1:200** (2 ml sono necessari per 2 strisce; mettere **10 µl** di CJ in **1990 µl** di CD).

2. Distribuzione del coniugato:

Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di coniugato diluito.

Coprire con un nuovo foglio di plastica adesiva (l'uso di una pellicola adesiva non è obbligatorio).

3. Incubazione del coniugato:

Incubare per 30 ± 5 min a temperatura ambiente (+23 ± 5°C)

LAVAGGIO: Rimuovere delicatamente la pellicola adesiva e procedere al lavaggio per 6 volte.

III - SVILUPPO

1. Aggiunta del substrato:

Aggiungere 100 µl di tampone substrato perossidasi (PS) in ogni pozzetto.

Non coprire con la pellicola adesiva. Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore assicurandosi della perfetta miscelazione.

2. Incubazione del substrato:

Incubare 15 ± 3 min a temperatura ambiente (+23 ± 5°C), al riparo dalla luce.

3. Aggiunta della soluzione stoppante:

Aggiungere 100 µl di soluzione stoppante (S) in ogni pozzetto.

Mescolare la piastra agitando delicatamente manualmente o con apposito agitatore. Assicurarsi che nei pozzetti non vi sia formazione di bolle.

4. Misurazione della densità ottica:

Misurare la densità ottica (OD) a 405 o a 410 nm.

Prima della lettura assicurarsi della pulizia sotto i singoli pozzetti della piastra.

La piastra può essere letta fino a 24 ore dopo aver stoppato la reazione.

VII. VALIDAZIONE DEL TEST

I risultati di ciascun test sono validi se:

-la media dei valori delle densità ottiche OD del controllo positivo (P) è ≥ 0.5, e,

-la media dei valori delle densità ottiche OD del controllo negativo (N) è < 0.300.

VIII. CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Calcolare per ogni campione il rapporto S/P

- Calcolare la media delle OD se lo stesso campione è stato esaminato più volte.

La S/P viene calcolata seguendo la formula:

$$S/P = \frac{OD_{Campione} - \overline{OD}_N}{\overline{OD}_P - \overline{OD}_N}$$

\overline{OD} = media delle densità ottiche.

RISULTATI

Ogni campione **individuale** di siero/plasma che ha un rapporto S/P ≥ 0.3 deve essere considerato **positivo**.

Ogni campione **individuale** di siero/plasma che ha un rapporto S/P < 0.25 deve essere considerato **negativo**.

Campioni dubbi:

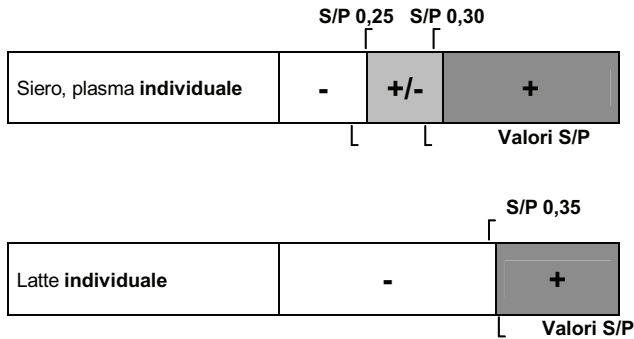
Ogni campione **individuale** di siero/plasma che ha un rapporto S/P ≥ 0.3 deve essere considerato **positivo**

Ogni campione di **latte** individuale o a pool fino a 200, che ha un rapporto S/P compreso tra 0.25 e 0.30 ≥ 0.25 è da considerarsi **dubbio** e andrebbe ripetuto.

Se il risultato dubbio dovesse riconfermarsi, si consiglia di eseguire un secondo prelievo allo stesso animale e eseguire nuovamente il test.

Ogni campione di **latte** individuale che ha un rapporto S/P > 0.35 è da ritenersi **positivo**.

Ogni campione di **latte** individuale che ha un rapporto S/P < 0.35 è da ritenersi **negativo**.



In caso di problemi, contattare:
 SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
 69367 LYON Cedex 07 – France
 Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10
 www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

FOR VETERINARY USE ONLY /
 FOR IN VITRO USE ONLY

Impianti certificati per la protezione dell'ambiente