

CATTLETYPE® MAP Ab

ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*



Gebrauchsinformation

in vitro-Diagnostikum für Rind, Schaf, Ziege

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17 c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 471

Verwendungszweck

Der CATTLETYPE® MAP Ab ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Serum, Plasma und Milchproben von Rindern und Ziegen sowie in Serum und Plasma von Schafen.

Allgemeine Informationen

Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) ist eine nicht heilbare Infektionskrankheit mit jahrelanger Inkubationszeit und chronischem Verlauf, die im Finalstadium durch Abmagerung und bei Rindern durch unstillbaren Durchfall gekennzeichnet ist. Der Erreger *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) kommt weltweit in Beständen von Wiederkäuern vor. Der CATTLETYPE® MAP Ab ELISA ermöglicht den Nachweis von Antikörpern gegen MAP und eignet sich zur Quantifizierung von Antikörpern gegen MAP in Serum-, Plasma- und Milchproben von Rindern und Ziegen sowie in Serum und Plasma von Schafen.

Beschreibung des Testprinzips

Die Proben werden zuerst in einem Puffer, der inaktivierten *Mycobacterium phlei*-Extrakt enthält, verdünnt und vorinkubiert. Damit werden Kreuzreaktionen mit atypischen Mykobakterien minimiert. Die Mikrotiterplatte ist mit MAP-Antigen beschichtet. Nach Übertragung der vorinkubierten Proben auf die antigenbeschichtete Mikrotiterplatte binden MAP-spezifische Antikörper an das immobilisierte Antigen, nichtgebundenes Material wird anschließend durch Waschen entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch einen Peroxidase-konjugierten anti-Wiederkäuer-IgG-Antikörper. Ungebundenes Konjugat wird herausgewaschen und die Farbreaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Nach Abstoppen der Reaktion wird die optische Dichte im Photometer gemessen; sie ist proportional zu der Konzentration der MAP-Antikörper in der Probe.

Bestellinformation

CATTLETYPE® MAP Ab	1 x 96 Bestimmungen	Artikelnummer 03-501/1
	5 x 96 Bestimmungen	Artikelnummer 03-501/5
	20 x 96 Bestimmungen	Artikelnummer 03-501/20

Reagenzien

	1er Kit	5er Kit	20er Kit
1. Testplatte, 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen bzw. Testplatte, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, beschichtet mit nicht-infektiösem MAP-Antigen	1	5	20
2. Waschpuffer (10×), Pufferlösung mit Tween, enthält Konservierungsmittel	125 ml	3 x 125 ml	1,0 l
3. Verdünnungspuffer, Pufferlösung mit inaktiviertem <i>M.-phlei</i> -Extrakt und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	20 ml	100 ml	400 ml
4. Positivkontrolle, MAP-reaktives Serum vom Rind, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1,5 ml	3,5 ml	2 x 3,0 ml
5. Negativkontrolle, MAP-negatives Serum vom Rind, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1,5 ml	3,5 ml	2 x 3,0 ml
6. Anti-IgG-HRP Konjugat, Kaninchen-anti-Wiederkäuer-IgG-Peroxidasekonjugat in Puffer mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	12 ml	60 ml	240 ml
7. TMB (Tetramethylbenzidin) Substratlösung, gebrauchsfertig	12 ml	60 ml	240 ml
8. Stopplösung, 0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig	12 ml	60 ml	240 ml

Benötigte Geräte und Materialien, die nicht mitgeliefert werden

Bechergläser, Messzylinder, Präzisionspipetten, Mehrkanalpipetten, Einwegpipettenspitzen, Pipettierwannen, Deckel oder Abklebefolie für Testplatten, Gerät zum Einfüllen und Absaugen von Waschlösung, Mikrotiterplatten-Photometer, Röhrchen oder geeignete Mikrotiterplatten für die Verdünnung der Proben, destilliertes Wasser

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Lagern Sie die Reagenzien bei 2-8 °C und bringen Sie diese erst unmittelbar vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18-25 °C). Eventuell gebildete Salzkristalle im Waschpuffer (10x) müssen durch Schwenken und leichtes Erwärmen wieder aufgelöst werden. Zur Vermeidung der Salzkristallbildung können Waschpuffer (10x, Flasche 2) und Stopplösung (Flasche 8) bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Waschpuffer-Gebrauchslösung sollte nicht länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 1 Woche bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Nicht benutzte Teststreifen sollen bis zur Verwendung im wieder verschlossenen Plattenbeutel mit Trockenmittel bei 2-8 °C gelagert werden. Nach erstmaliger Öffnung des Beutels sind die Teststreifen mindestens 6 Wochen haltbar.

Den Test sollten nur für Labortätigkeit qualifizierte Personen ausführen. Lagern Sie die TMB-Substratlösung im Dunkeln und setzen Sie diese während der Testdurchführung nicht starkem Lichteinfluss oder direktem Sonnenlicht aus. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. Benutzen Sie die Bestandteile des Testkits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums. Das für die Verdünnung des Pufferkonzentrates verwendete Wasser, insbesondere Wasser aus Ionenaustauscheranlagen, kann bei ungenügender Reinheit die Reaktion beeinträchtigen. Wasser mit der Qualität von bidestilliertem Wasser oder Reinstwasser (Milli-Q) ist geeignet.

Die für ELISA-Prozeduren übliche Umsichtigkeit wie die Verwendung sorgfältig gereinigter Glasmaterialien, sorgfältiges Pipettieren und Waschen während der Testdurchführung und die Einhaltung konstanter Inkubationszeiten sind unabdingbare Voraussetzungen, um die Genauigkeit der Messergebnisse zu gewährleisten.

Die Stopplösung enthält 0,5 M Schwefelsäure, Vorsicht.

Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen.

Nur für den tierärztlichen Gebrauch!

Reagenzienvorbereitung

Alle Reagenzien vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18-25 °C) bringen und durch Schwenken mischen.

Waschpuffer:

Waschpuffer (10×), Flasche 2, 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen,
z. B. für eine Testplatte 25 ml Waschpuffer (10×) in 225 ml destilliertem Wasser verdünnen und mischen.

Serum, Plasma:

Serum- und Plasmaproben sind **1:20** mit Verdünnungspuffer verdünnt im Test einzusetzen, z. B. 10 µl Serum oder Plasma in 190 µl Verdünnungspuffer verdünnen und mischen. Probenverdünnung und Vorinkubation erfolgen in Plastikröhrchen oder unbeschichteten Vorverdünnungsplatten. Die Pipettenspitze muss nach jeder Probe gewechselt werden. Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

Milch:

Milchproben müssen vor der Untersuchung entrahmt werden (durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 x g, 10 °C oder Stehenlassen der Proben bei 2-8 °C über Nacht). Die Testprobe sollte aus der flüssigen Phase direkt unter der Rahmschicht entnommen werden. Probenverdünnung und Vorinkubation erfolgen in Plastikröhrchen oder unbeschichteten Vorverdünnungsplatten. Die entrahmte Milch und die Kontrollen werden **1:2** in Verdünnungspuffer verdünnt (z. B. 70 µl Probe in 70 µl Verdünnungspuffer). Nach jeder Probe die Pipettenspitze wechseln.

Hinweis:

Beim Durchstechen des Rahms ist darauf zu achten, dass keine Rahmreste von der Pipettenspitze in die Kavität der Vorverdünnungsplatte gelangen. Gegebenenfalls sollte eine neue Spitze nach dem Rahmdurchstechen zur Probenentnahme verwendet werden. Fettreste können zu unspezifischen Reaktionen auf der Testplatte führen.

Testdurchführung für Serum und Plasma

1. **Vorinkubation:** Die verdünnten Proben 60-120 min bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 2-8 °C inkubieren. Plastikröhrchen verschließen bzw. Vorverdünnungsplatte abdecken (Deckel, Aluminium- oder Klebefolie).
2. **Befüllen der Testplatte:**

Registrieren der Kontrollen- und Probenlokalisierungen entsprechend der Vorlage.

Vorschlag für die Plattenbelegung für den CATTLETYPE® MAP Ab ELISA:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	P5	P13	P21	P29	P37	P45	P53	P61	P69	P77	P85
B	NK	P6	P14	P22	P30	P38	P46	P54	P62	P70	P78	P86
C	PK	P7	P15	P23	P31	P39	P47	P55	P63	P71	P79	P87
D	PK	P8	P16	P24	P32	P40	P48	P56	P64	P72	P80	P88
E	P1	P9	P17	P25	P33	P41	P49	P57	P65	P73	P81	P89
F	P2	P10	P18	P26	P34	P42	P50	P58	P66	P74	P82	P90
G	P3	P11	P19	P27	P35	P43	P51	P59	P67	P75	P83	P91
H	P4	P12	P20	P28	P36	P44	P52	P60	P68	P76	P84	P92

Jeweils 100 µl der gebrauchsfertigen Negativ- und Positivkontrolle (in Doppelbestimmung) sowie der vorinkubierten Proben in die Kavitäten der Testplatte pipettieren. Für ein zügiges Arbeiten wird die Verwendung einer Mehrkanalpipette empfohlen. Die Testplatte abdecken.

3. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.

4. 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
5. In jede Vertiefung 100 µl gebrauchsfertiges anti-IgG-HRP Konjugat geben.
6. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
7. 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
8. In jede Vertiefung 100 µl TMB Substratlösung geben.
9. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Beginn der Zeitmessung nach dem Füllen der ersten Vertiefung.
10. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Vertiefung. Die Stopplösung ist in der gleichen Reihenfolge wie die Substratlösung zuzugeben.
11. Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 450 nm und optional einer Referenzwellenlänge von 620-650 nm sofort oder innerhalb von 20 min nach dem Abstoppen.

Testdurchführung für Milch

1. **Vorinkubation:** Die verdünnten Proben 60–120 min bei Raumtemperatur inkubieren. Plastikröhrchen verschließen bzw. Vorverdünnungsplatte abdecken (Deckel, Aluminium- oder Klebefolie).

2. **Befüllen der Testplatte:**

Registrieren der Kontrollen- und Probenlokalisationen entsprechend der Vorlage (siehe Vorschlag für die Plattenbelegung unter Abschnitt „Testdurchführung für Serum und Plasma“).

Verdünnung der Kontrollen: In 4 Kavitäten 50 µl Probenverdünnungspuffer vorlegen. Jeweils 50 µl Negativ- und Positivkontrolle (in Doppelbestimmung) in die dafür vorgesehenen Kavitäten dazupipettieren.

100 µl der vorinkubierten Proben in die Kavitäten der Testplatte pipettieren. Für ein zügiges Arbeiten wird die Verwendung einer Mehrkanalpipette empfohlen. Die Testplatte abdecken.

3. Über Nacht bei 2-8°C inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
4. 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
5. In jede Vertiefung 100 µl gebrauchsfertiges anti-IgG-HRP Konjugat geben.
6. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
7. 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
8. In jede Vertiefung 100 µl TMB Substratlösung geben.
9. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Beginn der Zeitmessung nach dem Füllen der ersten Vertiefung.
10. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Vertiefung. Die Stopplösung ist in der gleichen Reihenfolge wie die Substratlösung zuzugeben.
11. Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 450 nm und optional einer Referenzwellenlänge von 620-650 nm sofort oder innerhalb von 20 min nach dem Abstoppen.

Testvalidierung

Für eine gültige Messung soll der Mittelwert (MW) der OD-Werte der Positivkontrolle einen Wert $\geq 0,7$ ergeben. Der MW der OD-Werte der Negativkontrolle soll $\leq 0,2$ sein. Bei ungültigen Testergebnissen sollte der Test nach gründlichem Lesen der Gebrauchsinformation wiederholt werden.

Auswertung

1. Aus den OD-Werten der Negativkontrolle sowie den OD-Werten der Positivkontrolle sind jeweils die Mittelwerte zu berechnen.
2. Vom OD-Wert der Probe und dem OD-Mittelwert der Positivkontrolle ist jeweils der OD-Mittelwert der Negativkontrolle abzuziehen.
3. Es ist das Verhältnis der OD der Probe (S) zum OD-Mittelwert der Positivkontrolle (P) nach der folgenden Formel zu berechnen:

$$\text{S/P-Quotient} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}$$

Beurteilung

Serum und Plasma

- **Proben mit einem S/P-Quotienten $< 0,4$ werden als negativ befundet.** Spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* wurden nicht nachgewiesen.
- **Proben mit einem S/P-Quotienten $\geq 0,4$ werden als positiv befundet.** Es wurden spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* nachgewiesen.

Milch

- **Proben mit einem S/P-Quotienten $< 0,6$ werden als negativ befundet.** Spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* wurden nicht nachgewiesen.
- **Proben mit einem S/P-Quotienten $\geq 0,6$ werden als positiv befundet.** Es wurden spezifische Antikörper gegen *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* nachgewiesen.