**Obecné informace**

Bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) se skládá z nejméně dvanácti různých sérotypů, z nichž některé nevyvolávají žádné onemocnění, ale jiné způsobují závažná onemocnění. ID Screen APP Screening Indirect je nepřímý diagnostický test určený k detekci specifických protilátek namířených proti bakteriím *Actinobacillus pleuropneumoniae* pomocí nepřímé metody ELISA. Tato souprava umožňuje detekci specifických protilátek proti všem sérotypům APP 1 až 12 v prasečím séru, plazmě nebo masové šťávě.

**Popis a princip**

Jamky jsou potaženy antigeny pro sérotypy APP 1 až 12. Vzorky, které mají být testovány, se přidají do jamek a mikrojamek.

Pokud jsou protilátky proti APP přítomny, vytvoří se komplex antigen-protilátka. Po promytí se protilátky navážou proti peroxidáze (HRP). Do jamek se přidá konjugovaná sekundární protilátka. Ta se naváže na protilátky a vytvoří se komplex antigen-protilátka.

Po vymytí přebytečného konjugátu, se přidá roztok substrátu (TMB). Výsledné zbarvení jamky závisí na množství:

* V přítomnosti protilátek modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku zbarví do žluté barvy.
* V nepřítomnosti protilátek se nezbarvuje.
* Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 450 nm.**Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| mikrodestičky potažené antigeny APP 1 až 12, |
| koncentrovaný konjugát (10x), |
| Pozitivní kontrola,  |
| Negativní kontrola,  |
| Ředící pufr 2,  |
| Ředící pufr 19,  |
| Koncentrovaný promývací roztok (20x),  |
| roztok substrátu (TMB) |
| stop roztok (0,5 M) |

\**dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy*

1. Konjugát, kontroly a roztoku substrátu musí být skladovaný při teplotě 5 °C.

2. Ostatní činidla lze skladovat při teplotě +2 až 26 °C.

3. Promývací roztok, substrát a stop roztok lze použít pro celou řadu produktů ID.vet. Ředící pufry se stejnými čísly šarží jsou zaměnitelné.

**Požadované materiály, které nejsou součástí balení:**

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro 5 μl, 10 μl, 100 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. 96 jamková mikrotitrační destička s předem naředěnými jamkami.
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
5. Manuální nebo automatický promývací systém.
6. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

**Bezpečnostní opatření**

1. Nepipetujte ústy.
2. Obsahuje složky, které mohou být škodlivé pro kůži a oči a mohou způsobit senzibilizaci kůže při styku s pokožkou. Použijte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice, ochranné brýle a další pomůcky. Stop roztok (0,5 M) může být škodlivý při použití.
3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.
4. Veškerý odpad by měl být před použitím řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání.
5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

**Příprava vzorku**

Abyste předešli rozdílným inkubačním dobám u jednotlivých vzorků, připravte si 96 jamkovou destičku s testovanými a kontrolními vzorky.

Poté přeneste testované vzorky a kontrolní roztoky do mikrotitrační destičky ELISA s využitím vícekanálové pipety.

**Příprava promývacích roztoků**

Před použitím temperujte koncentrovaný promývací roztok (20x) na pokojovou teplotu. Důkladně protřepejte, abyste zajistili, že bude mít dostatečnou teplotu. Promývací roztok (1x) nařeďte v poměru 1:20 v destilované/deionizované vodě. Kvalita promývacího kroku může ovlivnit výsledky. Mezi promýváním se ujistěte, že jsou jamky zcela prázdné, Používáte-li automatickou promývačku, je důležité správně nastavit parametry přístroje (režim, typ a výkon). Pro další informace nahlédněte do příručky ID.vet, která je k dispozici na adrese info@innovative-diagnostics.com.

**Postup testování**

Před použitím nechejte všechna činidla vychladnout na pokojovou teplotu 21 °C. Homogenizujte všechna činidla obrácením nebo kroužením.

PRO VZORKY SÉRA NEBO PLAZMY

1) Vzorky a kontroly se testují při konečném ředění 1:200 v ředícím pufru 20 (předředění 1:50, následné ředění 1:4 v mikrotitrační destičce). Do 96jamkové mikrodestičky s předředěním přidejte 5 μl negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 5 μl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 5 μl každého testovaného vzorku do zbývajících jamek,

- 245 μl ředícího pufru 2 do každé jamky.

b) Do mikrotitrační destičky ELISA přidejte:

- 25 μl předem naředěné negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 25 μl předem naředěné pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 25 μl každého předem naředěného vzorku, který má být testován v jamce č.1. zbývajících jamkách.

PRO VZORKY MASOVÉ ŠŤÁVY

1. Vzorky se testují při konečném ředění 1:10 a kontroly se testují v konečném ředění 1:200.

a) Předem se naředí pozitivní kontrola a negativní kontrola v poměru 1:200 v ředícím pufru 2.

b) Do mikrodestičky ELISA přidejte:

- 100 μl předem naředěné negativní kontroly do jamek A1 a B1.

- 100 μl předem naředěné pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

- 90 μl ředícího pufru 2 a 10 μl ke každému z testovaných vzorků, do zbývajících jamek.

PRO VŠECHNY PROTOKOLY

2. Přikryjte destičku a inkubujte 30 minut ± 3 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

3. Jamky vyprázdněte. Každou jamku 3krát promyjte nejméně 300 μl promývacího roztoku. Zabraňte vysychání jamek mezi promýváním.

4. Připravte konjugát 1x naředěním 10x koncentrovaného konjugátu v poměru 1:10 v ředícím pufru 19.

5. Do každé jamky přidejte 100 μl konjugátu 1x

6. Přikryjte destičku a inkubujte 30 minut ± 3 minuty při teplotě 21 °C (± 5 °C).

7. Vyprázdněte jamky. Každou jamku třikrát promyjte alespoň 300 μl promývacího roztoku.

****

Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

8. Do každé jamky přidejte 100 μl roztoku substrátu.

9. Zakryjte mikrodestičku a inkubujte 15 minut ± 2 minuty při 21 °C (± 5 °C) ve tmě.

10. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku, ve stejném pořadí jako v kroku číslo 8, aby se reakce zastavila.

11. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

✓ střední hodnota pozitivní kontroly OD (ODPC) je větší než 0,350.



✓ poměr středních hodnot OD pozitivní a negativní kontroly (ODPC a ODNC) je větší než 3.



Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

www.innovative-diagnostics.com

E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Tel: + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

**Vyhodnocení:**

Pro každý vzorek vypočítejte hodnotu S/P (S/P%):



Vzorky (sérum, plazma a masová šťáva) vykazující S/P%:

* + menší nebo rovné 25 %, se považují za **negativní**.
	+ mezi 25 % a 30 % jsou považovány za **sporné** **(hraniční)**
	+ vyšší nebo rovné 30 % se považují za **pozitivní**.

**Poznámka**:

K dispozici je program pro analýzu dat IDSoft zdarma. Pro více informací se obraťte na email oddělení technické podpory: support.software@innovative-diagnostics.com

Tento program vypočítává mnoho parametrů (kritéria platnosti, hodnoty S/P, titry nebo věk), dále nabízí grafické znázornění a sérologické profily testovaných zvířat.

ID Screen

APP Screening Indirect

**Nepřímý test ELISA pro detekci protilátek proti *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotypy 1 až 12 ve vzorcích prasečího séra, plazmy nebo masové šťávy**

Použití *in vitro*

**192 testů, 960 testů**

**Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.**