**Obecné informace**

Tato diagnostická souprava je určena k detekci protilátek proti *Mycoplasma bovis*. Lze ji použít s hovězím sérem, plazmou nebo mlékem (jednotlivé, směsné nebo hromadné vzorky mléka).

**Popis a princip**

Mikrodestičky jsou potaženy rekombinantním antigenem *M. bovis*. Vzorky a kontroly, které mají být otestovány, přidejte do jamek mikrodestičky. Jsou-li přítomny protilátky proti *M. bovis*, vytvoří komplex protilátka-antigen. V dalším kroku se k reakční směsi přidává konjugát Anti-M.bovis-HRP značený křenovou peroxidázou, který se váže na již přítomný komplex za vzniku konjugovaného komplexu protilátka-antigen-HRP. Tento komplex je následně detekován při analýze metodou ELISA.

Po vymytí přebytečného konjugátu přidejte roztok substrátu (TMB).

Výsledné zbarvení jamek závisí na množství specifických protilátek přítomných v testovaném vzorku.

* v přítomnosti protilátek se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop roztoku změní na žluté.
* v nepřítomnosti protilátek se zbarvení neobjeví.

**Mikrotitrační destička se odečítá při vlnové délce 450 nm.**

**Součásti soupravy**

|  |
| --- |
| **Reagencie\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným rekombinantním antigenem *M. bovis* |
| Koncentrovaný konjugát (10x) |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 13 |
| Ředící pufr 3 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu (TMB)  |
| Stop roztok (0,5 M) |

*\*dodávané množství je uvedeno na štítku soupravy*

1. Konjugát, destičky, kontroly a roztok substrátu musí být skladován při teplotě 5 °C (± 3 °C).
2. Ostatní reagencie lze skladovat mezi +2 °C až +26 °C.
3. Podrobné podmínky skladování otevřených a/nebo uzavřených součástí soupravy naleznete na:

*www.innovative-diagnostics.com/storage-conditions*

1. Promývací a stop roztoky lze použít pro celou skupinu produktů ID.Vet. Substrátové roztoky a ředící pufry se stejnými čísly šarží je možné používat i mezi soupravami.

**Požadované materiály, které nejsou součástí balení**

1. Jedno nebo vícekanálové pipety pro 5 μl, 50 μl, 100 μl, 200 μl a 500 μl.
2. Jednorázové špičky.
3. Destilovaná nebo deionizovaná voda.
4. Manuální nebo automatický promývací systém.
5. Čtečka 96 jamkových mikrodestiček.

**Bezpečnostní opatření**

1. Nepipetujte ústy.

2. Obsahuje složky, které mohou být škodlivé pro pokožku i oči a při kontaktu mohou způsobit podráždění. Pracujte tak, aby nedocházelo ke kontaktu s pokožkou a očima. Používejte ochranný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Stop roztok (0,5 M) může být při požití škodlivý.

3. Nevystavujte roztok substrátu přímému světlu ani oxidačním činidlům.

4. Veškerý odpad by měl být před likvidací řádně dekontaminován. Odpad likvidujte podle místních právních předpisů. Podrobnější informace naleznete v bezpečnostním listu, který je k dispozici na vyžádání nebo na adrese info@innovativediagnostics.com.

5. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.

**Příprava vzorku**

***Všechny typy vzorků***

Abyste předešli rozdílným inkubačním dobám u jednotlivých vzorků, připravte si 96 jamkovou destičku s testovanými a kontrolními vzorky. Připravené roztoky přeneste do mikrotitrační destičky ELISA za použití vícekanálové pipety.

***Vzorky mléka***

Tento test lze provádět na vzorcích odstředěného nebo plnotučného mléka, s konzervačními látkami nebo bez nich.

Při analýze vzorků plnotučného mléka jsou nutná zvláštní opatření pro promývání (viz "Doporučení pro testování mléka", které je k dispozici u výrobce na vyžádání).

Odstřeďte vzorek plnotučného mléka nebo nechte vzorky odstát, aby se smetana oddělila od mléčného zrna (smetana nahoře, mléčné zrno dole): Pipetou odeberte vzorek tak, abyste odebrali pouze laktosérum (protilátky se nacházejí v laktoséru).

**Příprava promývacího roztoku**

Pokud je to nutné, nechejte promývací koncentrovaný roztok (20x) po vyjmutí z chladničky pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a důkladně promíchejte, aby se zajistilo, že je promývací koncentrovaný roztok zcela homogenní.

Připravte si pracovní promývací roztok (1x) zředěním promývacího koncentrovaného roztoku (20x) v destilované nebo deionizované vodě v poměru 1.20.

Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Mezi promývacími kroky se ujistěte, že jsou jamky zcela prázdné. Používáte-li automatickou promývačku, ujistěte se, že máte správně nastaveny parametry přístroje (režim, typ a výkon).

Další informace naleznete "Průvodce promýváním ID.Vet", který je k dispozici u výrobce na vyžádání.

**Postup testování**

Před použitím nechejte všechna činidla ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Homogenizujte všechna činidla obrácením nebo kroužením. Pomocí krátkého inkubačního protokolu je možné testovat v jednom cyklu současně vzorky séra, plazmy i mléka. Výrobce doporučuje použít pro zvýšení citlivosti protokol pro noční inkubaci určený pro vzorky mléka, který je popsán níže. Protokol pro mléko umožňuje vynikající korelaci mezi párovými vzorky séra a mléka.

**Krátký inkubační protokol (pro vzorky séra, plazmy a mléka v jednom cyklu):**

1. Přidejte kontrolní roztoky:

* Do jamek A1, B1, C1 a D1 přidejte 195 μl ředícího pufru 13 (pro kontrolní roztoky).
* 5 μl negativní kontroly do jamek A1 a B1.
* 5 μl pozitivní kontroly do jamek C1 a D1.

*a) Pro vzorky séra nebo plazmy přidejte:*

* 195 μl ředícího pufru 13 do každé jamky.
* 5 μl testovaného vzorku séra nebo plazmy.

*b) Pro vzorky mléka (jednotlivé i směsné):*

Viz oddíl "Příprava vzorků mléka". Přidejte:

* 50 μl ředícího pufru 13 do každé jamky.
* 100 μl testovaného vzorku mléka.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **45 minut ± 4 minuty** při teplotě 21 °C. (± 5 °C).

**Inkubační protokol přes noc pouze pro mléko (jednotlivé i směsné vzorky mléka):**

1. Následujícím postupem přeneste na mikrotitrační destičku ELISA neředěné vzorky a kontroly v konečném ředění 1:101.

a) Připravte si negativní mléčnou kontrolu a pozitivní mléčnou kontrolu ředěním negativní a pozitivní kontroly v poměru 1:101 v ředícím pufru 13, přičemž pro každou kontrolu použijte jednu mikrozkumavku s 1000 μl pufru a 10 μl kontroly.

b) Do mikrotitrační destičky ELISA přidejte:

* + 50 μl ředícího pufru 13 do každé jamky (pro kontrolní roztoky i vzorky).
	+ 100 μl negativní mléčné kontroly připravené podle výše uvedeného postupu do jamek A1 a B1.
	+ 100 μl pozitivní mléčné kontroly připravené podle výše uvedeného postupu do jamek C1 a D1.
	+ 100 μl testovaného vzorku mléka do zbývajících jamek.

2. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **přes noc (16-20 hodin)** při teplotě 21 °C (± 5 °C).

**Pokračující pracovní postup pro oba protokoly:**

3. Vypláchněte jamky. Každou jamku promyjte\* alespoň třikrát alespoň 300 μl promývacího roztoku v každém kroku. Dbejte na to, aby se jamky mezi promývacími kroky nevysušily.

*\*Poznámka: Pokud testujete vzorky mléka, dbejte na to, aby po promytí nezůstal v jamce žádný tukový kroužek. Tomu je možné zabránit, pokud mezi jednotlivé promývací cykly zařadíte krok namáčení na 2-5 minut nebo můžete provést další promývací cykly (až 6). Tyto dodatečné proplachy můžete také zařadit při testování vzorků séra/plazmy společně se vzorky mléka, aniž by to mělo vliv na výkonnost testu u těchto typů vzorků.*

4. Připravte si pracovní roztok konjugátu (1x) zředěním koncentrovaného roztoku konjugátu (10x) v poměru 1:10 v ředícím roztoku 3.

5. Do každé jamky přidejte 100 μl zředěného roztoku konjugátu (1x).

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

7. Jamky vyprázdněte. Každou jamku 3krát 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. Pečlivě utěsněte destičku a inkubujte **15 minut ± 2 minuty** při teplotě 21 °C (± 5 °C) v temnu.

10. Do každé jamky přidejte 100 μl stop roztoku ve stejném pořadí jako v kroku č. 8, abyste zastavili reakci.

11. Odečtěte a zaznamenejte hodnotu OD při 450 nm.

**Kontrola:**

Test je platný, pokud:

* průměrná hodnota pozitivní kontroly OD (ODPC) je vyšší než 0,350.
* poměr středních hodnot pozitivní a negativní kontroly ODPC a ODNC je větší než 3.

**Vyhodnocení:**

**Krátký inkubační protokol**

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



|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **Vzorky séra nebo plazmy** |
| **S/P < 60 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **S/P ≥ 60 %** | **POZITIVNÍ** |
| **Jednotlivé i směsné vzorky** |
| **S/P < 20 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **S/P ≥ 20 %** | **POZITIVNÍ** |

**V případě potřeby mohou být**

**pozitivní výsledky klasifikovány následovně:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Status** |
| **Vzorky** **séra nebo plazmy** | **Vzorky** **mléka** |
| **60 % ≤ S/P < 80 %** | **20 % ≤ S/P < 40 %** | **+** |
| **80 % ≤ S/P < 110 %** | **40 % ≤ S/P < 60 %** | **++** |
| **110 % ≤ S/P < 140 %** | **60 % ≤ S/P < 80 %** | **+++** |
| **S/P ≥ 140 %** | **S/P ≥ 80 %** | **++++** |

**Inkubační protokol přes noc (pouze pro vzorky mléka)**

Pro každý vzorek mléka vypočítejte hodnotu S/P (S/P %).



|  |
| --- |
| **Individuální nebo směsné vzorky mléka** |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| **S/P < 30 %** | **NEGATIVNÍ** |
| **S/P ≥ 30 %** | **POZITIVNÍ** |

**V případě potřeby mohou být**

**pozitivní výsledky klasifikovány následovně:**

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Klasifikace pozitivity** |
| **30 % ≤ S/P < 50 %** | **+** |
| **50 % ≤ S/P < 100 %** | **++** |
| **100 % ≤ S/P < 150 %** | **+++** |
| **S/P ≥ 150 %** | **++++** |

**ID Screen**

***Mycoplasma bovis* Indirect**



**Nepřímá metoda ELISA pro detekci protilátek proti**

***Mycoplasma bovis* v séru, plazmě nebo mléce skotu**

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

**Pouze pro použití *in vitro***

**Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.**