# Obecná informace

*Mycoplasma hyopneumoniae* způsobuje prasečí enzootickou pneumonii, vysoce nakažlivé a chronické onemocnění postihující prasata. Jde o problém v živočišné výrobě, protože způsobuje výrazné snížení hmotnosti prasat.

Kompetitivní ELISA umožňuje detekci protilátek proti *Mycoplasma hyopneumoniae* v prasečím séru nebo plazmě.

Specifičnost testu je zaručena použitím vysoce specifické monoklonální protilátky zaměřené proti konzervovanému epitopu proteinu P65 *M. hyopneumoniae*, který nereaguje zkříženě s *M. flocculare*, *M. hyorinis* nebo *M. hyosynoviae.*

# Popis a princip

Jamky jsou potaženy antigenem *M. hyopneumoniae*.

Vzorky a kontroly, které mají být otestovány, přidejte do jamek mikrodestičky. Jsou-li přítomny protilátky proti *M. hyopneumoniae*, vytvoří komplex protilátka-antigen, který maskuje proteinové epitopy.

Do jamek mikrodestičky přidejte konjugát „anti-P65-peroxidáza“ (HRP). Ten se naváže se na zbývající volné epitopy za vzniku komplexu antigen-konjugát-HRP.

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.

# Mikrodestička se odečítá při 450 nm.Součásti soupravy

|  |
| --- |
| **Činidla\*** |
| Mikrodestičky potažené přečištěným antigenem *M. hyopneumoniae* |
| Konjugát Anti-P65-HRP – připraven k použití |
| Pozitivní kontrola |
| Negativní kontrola |
| Ředící pufr 19 |
| Promývací koncentrát (20x) |
| Roztok substrátu (TMB) |
| Stop roztok (0,5 M) |

\* *Dodávaná množství jsou uvedena na štítku sady*

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 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 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 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.

# Příprava promývacího roztoku

Pokud je to nutné, nechejte před použitím koncentrovaný promývací roztok (20x) ohřát na pokojovou teplotu. Důkladně protřepejte, abyste zajistili, že promývající roztok bude homogenní. Připravte si pracovní promývací roztok (1x) naředěním koncentrovaného promývacího roztoku (20x) v poměru 1:20 v destilované nebo deionizované vodě. Kvalita promývacího roztoku může ovlivnit výsledky. Mezi promývacími kroky 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 vyžádání u dodavatele nebo na adrese: info@innovative-diagnostics.com.

# Postup testování

Před použitím nechejte všechna činidla ohřát na pokojovou teplotu (21 °C ± 5 °C). Homogenizujte všechna činidla obrácením nebo kroužením.

**Doporučený protokol:**

1. Do jamek mikrodestičky ELISA přidejte:

* 50 µl ředícího pufru 19 do každé jamky.
* 50 µl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.
* 50 µl negativní kontroly do jamek C1 a D1.
* 50 µl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Destičku pečlivě utěsněte, třepejte na třepačce destiček po dobu 1 minuty a inkubujte **45 minut ± 4 minuty** při teplotě **37 °C** (± 2 °C).

**Alternativní protokol s menším objemem vzorku:**

1. Do jamek mikrodestičky ELISA přidejte:

* 80 µl ředícího pufru 19 do každé jamky.
* 20 µl pozitivní kontroly do jamek A1 a B1.
* 20 µl negativní kontroly do jamek C1 a D1.
* 20 µl testovaného vzorku do zbývajících jamek.

2. Destičku pečlivě utěsněte, třepejte na třepačce destiček po dobu 1 minuty a inkubujte **90 minut ± 9 minuty** při teplotě **37 °C** (± 2 °C).

**Pokračující pracovní postup pro oba protokoly:**

1. Vypláchněte jamky. Promyjte každou jamku 3x alespoň 300 µl promývacího roztoku. Nenechávejte jamky mezi promývacími kroky vysušit.
2. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku konjugátu, který je hotový a připraven k použití.
3. Destičku pečlivě utěsněte a inkubujte **30 minut ± 3 minuty** při teplotě **21 °C** (± 5 °C)
4. Vyprázdněte jamky. Promyjte každou jamku 3x alespoň 300 µl promývacího roztoku. Nenechávejte jamky mezi promývacími kroky vysušit.
5. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku substrátu.
6. Destičku pečlivě utěsněte a inkubujte **15 minut ± 2 minuty** při teplotě **21 °C** (± 5 °C) ve tmě.
7. Přidejte 100 µl stop roztoku do každé jamky ve stejném pořadí jako v kroku č. 7, abyste zastavili reakci.
8. Odečtěte a zaznamenejte OD při 450 nm.

# Kontrola:

Test je platný, pokud:

* Střední hodnota OD negativní kontroly (ODNC) je větší než 0,7.



* poměr středních hodnot OD pozitivních a negativních kontrol (ODPC a ODNC) je menší než 0,3.



Vyhodnocení:

Pro každý vzorek vypočítejte poměr (S/N %).



Příklad hodnocení S/N %:

* + za pozitivní se považuje S/N méně nebo rovný 50 %
	+ za negativní se považuje S/N vyšší než 50 %

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Hodnocení** |
| S/N % ≤ 50 % | POZITIVNÍ |
| S/N % > 50 % | NEGATIVNÍ |

*Poznámka: Program pro analýzu dat IDSoft je k dispozici zdarma. Pro více informací prosím kontaktujte support.software@innovativediagnostics.com*

Tento softwarový program dokáže vypočítat mnoho parametrů (kritéria validace, hodnoty S/P nebo S/N, titry, vakcinační věk, skupiny) a nabízí grafické znázornění sérologických profilů testovaných zvířat.

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



**ID Screen**

***Mycoplasma hyopneumoniae* Competition**



**Kompetitivní ELISA pro detekci protilátek proti *Mycoplasma* *hyopneumoniae* v prasečím séru nebo plazmě**

**192 testů, 480 testů, 960 testů**

**Pouze pro použití *in vitro***

**Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.**