

flocktype[®] Mycoplasma Ms Ab – příručka

Pro detekci protilátek proti bakteriím
Mycoplasma synoviae



2 destičky (kat. č. FT274602)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Lipsko, Německo

Obsah

Obsah soupravy.....	3
Účel použití	3
Symbols	4
Kontrola kvality	4
Skladování	5
Bezpečnostní informace	5
Úvod.....	6
Princip	6
Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel.....	7
Důležitá upozornění	8
Všeobecná bezpečnostní opatření	8
Protokol: Postup testu ELISA	9
Důležité pokyny před zahájením	9
Co je třeba udělat, než začnete	9
Protokol: ELISA	10
Interpretace údajů.....	12
Kritéria validace	12
Výpočet.....	12
Interpretace výsledků.....	13
Rejstřík změn	15
Stručný průvodce pro test flocktype Mycoplasma Ms Ab.....	16

Obsah soupravy

flocktype Mycoplasma Ms Ab	(2)
Kat. č.	FT274602
Počet destiček	2
Test Plate (Testovací destička): mikrotitrační destička s 96 jamkami, potažená neinfekčním antigenem Ms	2
Sample Diluent (Ředidlo vzorku), připravené k použití	1× 125 ml
Negative Control (Negativní kontrola), připravená k použití	1× 3,5 ml
Positive Control (Pozitivní kontrola), připravená k použití	1× 3,5 ml
Wash Buffer (Promývací pufr), 10× koncentrát	1× 125 ml
Conjugate (Konjugát), připravený k použití	1× 24 ml
TMB Substrate (TMB substrát), připravený k použití	1× 24 ml
Stop Solution (Zastavovací roztok), připravený k použití	1× 24 ml
Příručka	1

Účel použití

Flocktype Mycoplasma Ms Ab je specifický a citlivý test ELISA určený k detekci protilátek proti bakteriím *Mycoplasma synoviae* ve vzorcích séra a plazmy z kuřat a krůt.

Pouze pro veterinární použití.

Symboly



Zákonný výrobce



Číslo šarže



Datum použitelnosti



Teplotní omezení pro skladování



Příručka



Katalogové číslo



Číslo materiálu



Pro vzorky odebrané u kuřat a krůt

Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu kvality společnosti INDICAL, certifikovaným podle norem ISO, byla každá šarže testu flocktype Mycoplasma Ms Ab testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena konzistentní kvalita produktu.

Skladování

Komponenty testu ELISA flocktype Mycoplasma Ms Ab by se měly uchovávat při teplotě 2-8°C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Wash Buffer (10×) a Stop Solution je možné skladovat při pokojové teplotě (18-25 °C), aby nedošlo ke krystalizaci solí. Jsou-li se soupravou dodány testovací stripy, zbývající testovací stripy do dalšího použití uložte do uzavíratelného sáčku s vysoušecím prostředkem při teplotě 2-8°C. Po otevření sáčku s destičkou lze testovací stripy skladovat po dobu 6 týdnů.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Jsou k dispozici u místního obchodního zástupce nebo na vyžádání e-mailem zasláným na adresu **compliance@indical.com**.



UPOZORNĚNÍ: Reagencie Stop Solution obsahuje 0,5 M kyseliny sírové.

Všechny zbytky vzorků a předměty, které přišly do styku se vzorky, je nutné dekontaminovat nebo zlikvidovat jako potenciálně infekční materiál.

Úvod

Test flocktype Mycoplasma Ms Ab je vysoce citlivé a specifické řešení pro detekci protilátek proti bakteriím *Mycoplasma synoviae* (*M. synoviae*, Ms) ve vzorcích séra a plazmy z kuřat a krůt.

Bakterie *Mycoplasma synoviae* se vyskytuje po celém světě a způsobuje u ptáků chronické respirační onemocnění. Systémová infekce vede k infekční synovitidě. Závažnost infekce závisí na sekundárních infekcích. Mykoplazmy ulpívají na respiračním epitelu a erytrocytech. Buněčná imunitní odpověď je pro infekce vyvolané bakteriemi *M. synoviae* nejdůležitější, ačkoli produkce specifických protilátek může být také indukována infekcemi a očkováním.

Test flocktype Mycoplasma Ms Ab využívá membránový protein bakterie *Mycoplasma synoviae* připravený rekombinantní technologií jako antigen. Tento protein je mezi kmeny *Mycoplasma synoviae* vysoce konzervovaný a je silně imunogenní.

Princip

Mikrotitrační destička je potažena rekombinantním proteinem, který je specifický pro bakterie *M. synoviae*.

Během inkubace vzorku se protilátky specifické pro Ms navážou na imobilizovaný antigen. Nenavázaný materiál se odstraní propláchnutím. Konjugát anti-IgY-HRP detekuje protilátky v séru navázané na antigen. Nenavázaný konjugát se odstraní propláchnutím.

Přidáním reagentie Substrate Solution se zahájí kolorimetrická reakce, která se po 15 minutách zastaví. V přítomnosti protilátek specifických pro Ms ve vzorku HRP katalyzuje vznik modré barvy, která se po přidání reagentie Stop Solution změní na žlutou. Ve spektrofotometru se změní optická denzita (Optical Density, OD). Hodnoty OD korelují s koncentrací protilátek proti Ms ve vzorku.

Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Kádinky
- Odměrné válce
- Pipety (nastavitelné)
- Vícekanálové pipety (nastavitelné)
- Hliníková nebo lepicí fólie k zakrytí destičky Test Plate
- Volitelné: Zařízení pro přívod a nasávání reagentie Wash Buffer
- Čtečka absorbance mikrotitračních destiček
- Zkumavky nebo destičky pro ředění vzorků
- Destilovaná voda

Důležitá upozornění

Všeobecná bezpečnostní opatření

Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

- Roztok TMB Substrate při provádění testu nevystavujte intenzivnímu světlu nebo slunečnímu záření.
- Komponenty testovací soupravy nesmí být kontaminovány.
- Nepoužívejte komponenty testovací soupravy s prošlým datem použitelnosti.
- Voda ze systému iontové výměny použitá ke zředění reagentie Wash Buffer (10×) může s testem interferovat, nebude-li dostatečně čistá. Použijte dvakrát destilovanou vodu nebo vysoce čištěnou vodu (Milli-Q®).
- Pro přesné výsledky testu je při provádění testu nutné používat čisté sklo, pečlivě pipetovat a promývat a přesně dodržovat inkubační doby.

Protokol: Postup testu ELISA

Důležité pokyny před zahájením

- Před zahájením práce si přečtěte část „Důležitá upozornění“ na straně 8.

Co je třeba udělat, než začnete

- Reagencie těsně před použitím vytemperujte na pokojovou teplotu (18-25°C). V případě, že jsou v reagentii Wash Buffer (10×) vysrážené krystaly soli, rozpusťte je jemným kroužením a zahřejtím.
- Reagentii Wash Buffer (10×) zředte destilovanou vodou v poměru 1:10. Například pro jednu destičku Test Plate zředte 25 ml reagentie Wash Buffer (10×) 225 ml destilované vody a promíchejte.
- Vzorky séra/plazmy: Před analýzou vzorků séra/plazmy tyto vzorky zředte reagentií Sample Diluent v poměru 1:500 (např. dejte 1 µl vzorku do 499 µl reagentie Sample Diluent) a důkladně promíchejte. K ředění použijte plastové zkumavky nebo nepotažené mikrotitrační destičky. Pro každý vzorek vyměňte pipetovací špičky.

Případně je možné vzorky séra/plazmy naředit z předběžného ředění (1:50 v reagentii Sample Diluent) přímo na destičce Test Plate (viz krok postupu 1a).

- Kontroly jsou připravené k použití a není nutné je ředit.

Protokol: ELISA

Prostudujte si prosím část „Co je třeba udělat, než začnete“ na straně 9.

Postup

1. Napipetujte 100 µl reagencie Negative Control (dvojmo) i reagencie Positive Control (dvojmo), které jsou již připravené k použití, a vzorky naředěné v poměru 1:500 do jamek destičky Test Plate.
- 1a. Případně napipetujte 90 µl reagencie Sample Diluent do každé jamky na vzorek a přidejte 10 µl vzorku předem naředěného v poměru 1:50. Dobře promíchejte.

Poznámka: Zaznamenejte pozice kontrol a vzorků do protokolu o testu. Pro přenos vzorků se doporučuje používat multikanálovou pipetu. Zakryjte destičku Test Plate.

2. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C).
3. Odsátím nebo poklepáním odstraňte roztok z jamek.
4. Každou jamku 3× propláchněte 300 µl připravené reagencie (1×) Wash Buffer. Pufr po každém propláchnutí odstraňte odsáním nebo poklepáním.
5. Pipetou přidejte 100 µl reagencie Conjugate připravené k použití do každé jamky a inkubujte 30 min při pokojové teplotě (18-25°C).
6. Odsátím nebo poklepáním odstraňte roztok z jamek.
7. Každou jamku 3× propláchněte 300 µl připravené reagencie (1×) Wash Buffer. Pufr po každém propláchnutí odstraňte odsáním nebo poklepáním.
8. Pipetou do každé jamky přidejte 100 µl reagencie TMB Substrate Solution.
9. Inkubujte 15 min v temnu při pokojové teplotě. Po naplnění první jamky začněte měřit čas.

10. Reakci zastavte přidáním 100 μ l reagencie Stop Solution do každé jamky. Reagencii Stop Solution přidávejte ve stejném pořadí jako při přidávání reagencie Substrate Solution.
11. Do 20 min od zastavení reakce změřte OD ve čtečce destiček při vlnové délce 450 nm.
Měření při referenční vlnové délce (620-650 nm) je nepovinné.

Interpretace údajů

Kritéria validace

Výsledky jsou platné, pokud budou splněna tato kritéria:

- Střední hodnota (Mean Value, MV) naměřené hodnoty OD pro reagensii Positive Control (PC) musí být $\geq 0,7$.
- Hodnota (MV) naměřené hodnoty OD pro reagensii Negative Control (NC) musí být $\leq 0,2$.

V případě neplatných analýz je nutné si pečlivě přečíst návod k použití a test zopakovat.

Výpočet

Vypočtete hodnoty MV změřené hodnoty OD pro reagensii Negative Control (NC) a Positive Control (PC).

Poměr (S/P) hodnoty OD vzorku ke střední hodnotě OD reagensie Positive Control se vypočte z této rovnice:

$$S/P = \frac{OD_{\text{vzorek}} - MV_{OD_{NC}}}{MV_{OD_{PC}} - MV_{OD_{NC}}}$$

Titry koncových bodů se vypočítají z poměru S/P při ředění 1:500 pomocí následující rovnice:

$$\text{Log}_{10} \text{ titr} = 1,12 (\text{Log}_{10} S/P) + 3,83$$

Interpretace výsledků

- **Vzorky s poměrem S/P < 0,1 jsou negativní.**
Nebyly zjištěny specifické protilátky proti bakteriím *Mycoplasma synoviae*.
- **Vzorky s poměrem S/P \geq 0,1 a < 0,2 jsou suspektní.**
Suspektní výsledky by měly být seskupeny do většiny pozitivních nebo negativních výsledků. Suspektní výsledky doporučujeme znovu testovat po několika týdnech.
- **Vzorky s poměrem S/P \geq 0,2 jsou pozitivní.**
Byly zjištěny specifické protilátky proti bakteriím *Mycoplasma synoviae*.

Pro další diagnostické sérologické výsledky doporučujeme identifikovat patogen získaný z tracheálních výtěrů pomocí PCR v reálném čase (např. sada bactotype® Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit).

Společnost INDICAL nabízí řadu souprav ELISA a souprav pro PCR v reálném čase a souprav pro RT-PCR v reálném čase pro detekci zvířecích patogenů.

Další informace o produktech afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir a virotype naleznete na internetových stránkách **www.indical.com**.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti pro konkrétní produkty jsou uvedeny v příručce pro soupravu INDICAL nebo příručce uživatele.

Omezená licenční smlouva pro test flocktype Mycoplasma Ms Ab

Použitím produktu jeho kupující nebo uživatel vyjadřuje souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze se součástmi dodanými v soupravě. Společnost INDICAL neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.indical.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků INDICAL pro jiné uživatele výrobků INDICAL. Tyto protokoly nebyly společností INDICAL důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost INDICAL nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Mimo výslovně uvedené licence INDICAL neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepřepřerovat ani opakovaně prodávat.
4. INDICAL specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost INDICAL může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou a/nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky naleznete na internetových stránkách www.indical.com.

Ochranné známky: afosa[®], bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], pigtype[®], Svanovir[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Milli-Q[®] (Merck KGaA, , Německo). Registrované názvy, ochranné známky, atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

HB-1643-CZ-005 © 2018-2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, všechna práva vyhrazena.

Rejstřík změn

Příručka	Verze	Změna
HB-1643-EN-005	Červen 2022	Změna inkubační doby TMB na 15 min a redakční změny
HB-1643-EN-004	Červen 2018	Design INDICAL

Stručný průvodce pro test flocktype Mycoplasma Ms Ab

Ředění vzorku:

Sérum, plazma 1:500, dobře promíchat

Krok	Protokol
1. Vzorek	100 µl do každé jamky
2. Inkubace	30 min při pokoj. tepl.
3. Promytí	3x 300 µl
4. Konjugát	100 µl do každé jamky
5. Inkubace	30 min při pokoj. tepl.
6. Promytí	3x 300 µl
7. TMB	100 µl do každé jamky
8. Inkubace	15 min při pokoj. tepl.
9. Zastavení reakce	100 µl do každé jamky
10. Odečet	450 nm

Interpretace údajů

	Negativní	Suspektní	Pozitivní
Sérum, plazma	S/P < 0,1	S/P ≥ 0,1 a < 0,2	S/P ≥ 0,2