**Testovací sada na průkaz protilátek proti *Mycoplasma meleagridis***

**Pouze k veterinárnímu užití**

**Název a zamýšlené užití**

IDEXX MM je enzymatický imunologický test firmy IDEXX pro detekci protilátek proti *Mycoplasma meleagridis* (Mm) ve vzorcích krůtího séra.

**Obecné informace**

Hejna drůbeže jsou vnímavá vůči respiračním onemocněním způsobovaným řadou různých původců. Mezi ně patří i mykoplazmata. Běžnými typy mykoplazmových infekcí jsou chronická respirační onemocnění, airsacculitida, sinusitida a synovitida.1,2 V mnoha případech lze tyto infekce nicméně identifikovat pouze pomocí sérologie, kultivace nebo metod PCR. Pro usnadnění monitoringu expozice hejna mykoplazmaty lze využít měření hladiny protilátek proti mykoplazmatům v séru.

**Popis a principy**

Tento test slouží k měření relativní hladiny protilátek proti Mm v krůtím séru. Antigen Mm je nanesen na destičkách s 96 jamkami. V průběhu inkubace testovaného vzorku v potahované jamce destičky vytvoří specifické protilátky proti Mm komplex s naneseným antigenem. Po vymytí nenavázaného materiálu z jamek se přidá konjugát, který se naváže na jakékoli protilátky zachycené v jamkách. Nenavázaný konjugát se vymyje a přidá se enzymový substrát. Následný rozvoj zbarvení přímo odpovídá množství protilátek proti Mm přítomných v testovaném vzorku.

**Reagencie Objem**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | Destičky potažené antigenem Mm | 5 |
| 2 | Pozitivní kontrolní vzorek - zředěné krůtí anti-Mm sérum; konzervováno azidem sodným | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Negativní kontrolní vzorek – zředěné krůtí sérum nereagující na Mm; konzervováno azidem sodným | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Konjugát – (Kozí) anti-krůtí HRPO konjugát; konzervováno gentamycinem a Proclinem | 1 x 50 ml |
| 5 | Ředicí roztok – konzervováno azidem sodným | 1 x 235 ml |
| A | TMB substrát  | 1 x 60 ml |
| B | Zastavovací roztok  | 1 x 60 ml |

Poznámka: Popis symbolů použitých v návodu a popiscích této soupravy naleznete na konci letáku.

**Uchovávání**

Reagencie uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Reagencie jsou za předpokladu řádného skladování stabilní do data exspirace.

**Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy**

* Přesné pipety nebo multikanálové pipety
* Jednorázové pipetovací špičky
* Čtečka mikrodestiček s 96 jamkami (vybavená filtrem s vlnovou délkou 650 nm)
* Mycí zařízení na mikrodestičky (manuální, poloautomatický nebo automatický systém)
* Pro přípravu reagencií používaných při testu používejte pouze destilovanou nebo deionizovanou vodu
* Vortex nebo ekvivalentní třepačka

**Bezpečnostní opatření a upozornění pro uživatele**

* Se všemi biologickými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními. Antigen použitý v testovací soupravě nemusí být plně inaktivován.
* Při manipulaci se vzorky a reagenciemi používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí nebo obličeje.
* Další informace najdete v materiálových bezpečnostních listech.
* Upozornění a bezpečnostní opatření pro použití reagencií najdete na konci tohoto letáku.

**Laboratorní praxe**

* Pro dosažení optimálních výsledků přesně dodržujte tento protokol. K zachování přesnosti a správnosti je nezbytné pečlivé pipetování, měření času a promývání během postupu. Pro každý vzorek a kontrolu použijte vždy novou pipetovací špičku.
* Roztok TMB nevystavujte silnému světlu nebo jakýmkoli oxidačním činidlům. Pro manipulaci s roztokem TMB používejte čisté skleněné nebo plastové nádoby.
* Všechny odpady je třeba před likvidací řádně dekontaminovat. Obsah likvidujte v souladu s místními, regionálními a státními předpisy.
* Snažte se zabránit kontaminaci složek soupravy. Nenalévejte nepoužité reagencie zpět do nádob.
* Nepoužívejte soupravu po datu exspirace.

**Příprava vzorků**

Testované vzorky před použitím v testu zřeďte pětsetkrát (1:500) přiloženým ředicí roztokem (např. 1 µl vzorku a 500 µl ředicího roztoku). POZNÁMKA: KONTROLNÍ VZORKY NEŘEĎTE. Pro každý vzorek použijte novou pipetovací špičku. Vzorky musí být před rozmístěním do potahovaných jamek důkladně promíchány.

**Postup testu**

Všechny reagencie použité v tomto testu musí mít teplotu 18–26°C. Reagencie se míchají jemným obracením nebo kroužením.

1. Připravte si antigenem potažené mikrodestičky a zaznamenejte umístění vzorků.

2. Dejte 100 μl NEŘEDĚNÉHO negativního kontrolního vzorku (NK) do duplicitních jamek.

3. Dejte 100 μl NEŘEDĚNÉHO pozitivního kontrolního vzorku (PK) do duplicitních jamek.

4. Dejte 100 μl ZŘEDĚNÉHO vzorku do určených jamek. Vzorky se doporučuje testovat v duplikátech, ale lze použít i jen jednu jamku.

5. Inkubujte po dobu 30 minut (±2 min.) při teplotě 18–26°C.

6. Odstraňte roztok a každou jamku 3-5x promyjte přibližně 350 µl destilované nebo deionizované vody. Destička nesmí mezi umýváním a před přidáním příští reagencie vyschnout. Po posledním promytí odstraňte zbývající mycí tekutinu z každé destičky poklepáním na savý materiál.

7. Přidejte do každé jamky 100 μl konjugátu.

8. Inkubujte po dobu 30 minut (±2 min.) při teplotě 18–26°C.

9. Opakujte krok č. 6.

10. Přidejte do každé jamky 100 μl TMB substrátu.

11. Inkubujte po dobu 15 minut (±1 min.) při teplotě 18–26°C.

12. Přidejte do každé jamky 100 μl zastavovacího roztoku.

13. Změřte a zaznamenejte hodnotu absorbance při 650 nm, A (650).

**14. Výpočty**

**Kontrolní vzorky**

NKx = NK1 A(650) + NK2 A(650)

 2

PKx = PK1 A(650) + PK2 A(650)

 2

**Kritéria validity**

PKx – NKx > 0,075 NKx ≤ 0,150 PKx > 0,150

Při neplatnosti výsledků je třeba předpokládat chybu v technice provedení. Doporučuje se důkladně znovu prostudovat přiložený leták a test provést znovu.

**Vzorky**

S/P = Průměr vzorku – NKx Log10 Titr = 1,09 (log10 S/P) + 3,36\*
 PKx – NKx

\* Vztahuje S/P při ředění 1:500 ke koncovému titru.

Přítomnost nebo nepřítomnost protilátek proti Mm je určena vztažením hodnoty A(650) vzorku

k průměru pozitivní kontroly. Pozitivní kontrola je standardizovaná a reprezentuje významnou

hladinu protilátek proti Mm v séru. Relativní hladina protilátek ve vzorku je určena

výpočtem poměru vzorku k pozitivní kontrole (S/P). Koncové titry se vypočítají pomocí výše

uvedené rovnice.)

**15. Interpretace:**

Negativní: S/P ≤ 0,50

Pozitivní: S/P > 0,50

Pozitivní výsledek (titr vyšší než 1076) indikuje vakcinaci nebo jinou expozici Mm. Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní kritéria imunity s ohledem na titry protilátek založené na korelaci IDEXX MM

s aktuálními metodikami laboratorních testů a historickými protilátkovými odpověďmi.

**Poznámka:** Společnost IDEXX má k dispozici přístrojové a softwarové systémy pro výpočet výsledků a

poskytování souhrnů dat.

**Bibliografie**

1. S.H. Kleven. 1997. Mycoplasmosis in B.W. Calnek., ed. Diseases of Poultry, 10. vydání, str.191–193.

2. D.H. Ley a H.W. Yoder, Jr. 1997. Mycoplasma synoviae Infection in B.W. Calnek., ed. Diseases of Poultry, 10. vydání, str. 194–207.

**Technická podpora:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895

IDEXX Evropa Tel: +800 727 43399

Kontaktujte manažera nebo distributora společnosti IDEXX pro Vaši oblast nebo navštivte naši

webovou stránku: [www.idexx.com/production/contactlpd](http://www.idexx.com/production/contactlpd)

U.S. Vet. Licence č. 313

Kód výrobku: 5172.00

\*IDEXX a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky

společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností ve Spojených státech

amerických a/nebo v jiných zemích.

©2016 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**Upozornění**

**H316 / P332+P313/EUH208**

**Konjugát** – Způsobuje mírné podráždění pokožky. Používejte ochranné rukavice. Obsahuje Proclin. Může vyvolat alergickou reakci.

**H315/H319/** **P280 / P332+P313 / P337+P313**

**TMB substrát –** Způsobuje podráždění pokožky. Způsobuje závažné podráždění očí. Používejte

ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. Dojde-li k podráždění pokožky: Vyhledejte

lékařskou pomoc/ošetření. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

**Popis symbolů:**

Číslo šarže

Sériové číslo

Katalogové číslo

Diagnostika in vitro

Autorizovaný obchodní zástupce pro Evropu

Pozitivní kontrola

Negativní kontrola

Datum spotřeby

Datum výroby

Výrobce

Teplotní omezení

Viz návod k použití

Zásadní změna v návodu k použití

*Výrobce*

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive

Westbrook, Maine 04092

USA

*Zástupce pro EU*

IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofddorp

Nizozemsko