



## INGEZIM M.HYO COMPAC

Prod Ref: 11.MHY.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a *M.hyo*pneumoniae en suero porcino.

Blocking enzymatic immunoassay for detection of antibodies specific for *M.hyo*pneumoniae in swine serum

Última revisión / Last revision: 05-02-08

COMPOSICION DEL KIT ELISA  
ELISA KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras Strip-well plates (12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales con suero Control Positivo para M.hyo listo para uso Vials with Positive Control Serum for M.hyo ready to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales con suero Control Negativo para M.hyo listo para uso Vials with Negative Control serum for M.hyo ready to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales con Conjugado (AcM anti M.hyo- HRPO) listo para uso Vials with Conjugate (Mab anti M.hyo- HRPO) ready to use	1	30 ml	2	30 ml
Frascos con Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos con diluyente de suero (DE01- 01) a la dilución de uso Bottles with serum diluent (DE01-01) ready to use	1	125 ml	1	125 ml
Frascos con sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos con Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT  
OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Agua destilada o desionizada  
Micropipetas de 5 a 200 µl.  
Puntas de micropipeta de un solo uso  
Dispositivos para lavado de placas.  
Probetas de 50-250ml  
Lector ELISA (filtro de 450 nm)

Distilled or deionised water.  
Micropipettes from 5 to 200 µl.  
Disposable micropipette tips.  
Washing plates device.  
Test tubes from 50 to 250 ml  
ELISA Reader (450 nm filter)

## I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo), en ganado porcino. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de M.hyo. Cuando se añaden las muestras de suero en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado

específico marcado con peroxidasa. (Anticuerpo monoclonal específico para M.hyo). En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente al antígeno, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

## II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
6. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al bote el sustrato sobrante.

## III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

## IV. INFORMACIÓN SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.

- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

## V. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

---

### • Solución de lavado :

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado mas 960 ml de agua).

### • Sueros Controles:

Se suministran listos para uso (añadir 100µl por pocillo).

### • Preparación del conjugado:

- No necesita preparación previa. VIENE LISTO PARA USO (NO DILUIR)

## VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

---

Realizar una dilución 1/2 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50 µl de diluyente y luego 50 µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

## VII. PROCEDIMIENTO

---

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros:**
  - Añadir 100 µl de suero control positivo a dos pocillos y 100 µl de suero control negativo a otros dos pocillos.
  - Añadir otros 50 µl de diluyente al resto de los pocillos que se vayan a usar. Añadir 50 µl de los sueros problema a ensayar.
  - Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable valorar las muestras por duplicado
  - Tapar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C)
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado, a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 30 min. a temperatura ambiente (18-25°C).
5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
6. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
7. Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

### 1. VALIDACIÓN DE RESULTA-DOS

DO Control Positivo/DO Control Negativo < 0.25  
DO Control Negativo > 0.75

### 2. CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

Punto de Corte (-) = 0.45 x Control Negativo  
Punto de Corte (+) = 0.40 x Control negativo

### 3. CÁLCULO DE % DE BLOQUEO

$$\% \text{ BLOQUEO} = 100 - \frac{\text{DO muestra} \times 100}{\text{DO C. negativo}}$$

### 4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a M.hyo), cuando su DO a 450 nm sea igual o inferior al cut off positivo (40 % del control negativo).

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a M.hyo), cuando su DO a 450 nm sea igual o superior al cut off negativo (45% del control negativo).

Las muestras que presenten porcentajes de unión entre ambos valores se considerarán **DUOSAS** y en estos casos se recomienda testar de nuevo al animal transcurridas 2 semanas.

## I. TECHNICAL BASIS

---

The kit have been designed to detect antibodies specific for Mycoplasma hyopneumoniae (M.hyo) in swine serum.

The INGEZIM MHYO kit is based on the blocking immunoenzymatic assay described below:

Plates are coated with M.hyo antigen. After adding the sample to the well, if it contains specific antibodies against M.hyo, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the sample does not contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

If we add a specific monoclonal antibody against the M.hyo antigen coated to the plate (conjugated with peroxidase), it will compete with the antibodies of the serum. If sera samples contain specific antibodies, they will not permit the binding of the labelled MAb to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the MAb will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled MAb by adding the substrate (TMB) that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

## II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

---

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
10. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
11. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

---

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C.

## IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

---

The washing steps could be done using an automatic washing machine or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the next instructions:

- Throw out the content of the plate by a brusque turn over of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as much times as is indicated on the instructions of the Kit.
- Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

## V. PREPARATION OF REAGENTS

### • Washing solution:

Dilute one part of the 25x concentrated washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water (i.e. 40 ml of concentrate and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

### • Positive and Negative controls:

Controls are supplied ready to use (Add 100µl/well)

### • Preparation of the conjugate

**CONJUGATE IS SUPPLIED READY TO USE: DO NOT DILUTE**

## VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be assayed at a 1/2 dilution in diluent. This dilution could be made directly on the assay plate by adding 50 µl of diluent and 50 µl of sample to each well.

## VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 100µl of positive control to two wells and 100 µl of negative control to another two wells. Add 50 µl of diluent to remainder wells and then, add 50 µl of each sample to be assayed. We recommend running controls in duplicate wells. Seal the plate and incubate 1 hour at room temperature (18-25°C).
- Wash 4 times following the described procedure.
- Add 100 µl of conjugate, to each well. Seal the plate and incubate for 30 min at room temperature (18-25°C).
- Wash 6 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for 10 min at room temperature.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

In case that the samples had been run in duplicate, it has to be considered the mean of both OD values. In the same way, the mean of the values obtained in the two well of positive and the two well of negative control has to be made.

### 1. VALIDATION OF THE RESULTS

OD Positive Control / OD Negative Control < 0.25  
OD Negative Control > 0.75

### 2. CUT OFF CALCULATION

Cut Off (-) = 0.45 x Negative Control

Cut Off (+) = 0.40 x Negative Control

### 3. BLOCKING % CALCULATION

$$\text{Blocking \% of sample} = 100 - \frac{\text{Sample OD} \times 100}{\text{Negative control OD}}$$

### 4. RESULTS INTERPRETATION

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific for M.hyo), when de OD at 450nm was equal or lower than the positive cut off (40 % of negative control).

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for M.hyo in the sample) when the OD value at 450nm was equal or higher than the negative cut off (45% of negative control).

Samples with percentages of binding between both cut off have to be considered **DOUBTFUL**. In these cases a new sample of the animal is recommended to be analysed in two weeks.

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.  
C/ Hnos. García Noblejas, 39  
28037- MADRID (SPAIN)  
Tif: +34 91368.05.01/04  
Fax: +34 91 408.75.98  
E-mail: ingenasa@ingenasa.com  
www.ingenasa.es

Distributed in \_\_\_\_\_ by:

