



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Руководителя  
Россельхознадзора  
Н.А.Власов  
« 14 » \_\_\_\_\_ 2009 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для выявления антител к возбудителю микоплазмоза свиней  
*Mycoplasma hyorheumoniae* иммуноферментным методом  
«МИКОПЛАЗМА-СЕРОТЕСТ»  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к возбудителю микоплазмоза свиней *Mycoplasma hyorheumoniae* иммуноферментным методом «МИКОПЛАЗМА-СЕРОТЕСТ».

2. Состав набора

#### **Иммуноспецифические компоненты:**

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном *M. hyorheumoniae* – 2 штуки;

2). Положительный контроль ( $K^+$ ) - сыворотка крови свиней, содержащая антитела к *M. hyorheumoniae*, прозрачная жидкость от розового до красного цвета,  $2,0 \text{ см}^3$  – 1 пробирка;

3). Отрицательный контроль ( $K^-$ ) – нормальная сыворотка крови свиней, не содержащая антител к *M. hyorheumoniae*, прозрачная жидкость от голубого до синего цвета,  $2,0 \text{ см}^3$  – 1 пробирка;

4). Моноклональные антитела к *M. hyorheumoniae*, меченные пероксидазой хрена (**Конъюгат**), прозрачная жидкость от голубого до синего цвета,  $30,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;

#### **Неспецифические компоненты:**

5). 20-кратный концентрат буферного раствора для разведения испытуемых проб и промывания планшетов (**ФСБТ**), бесцветная прозрачная жидкость,  $25,0 \text{ см}^3$  – 3 флакона;

6). Хромоген-субстратный раствор (**СР**), бесцветная прозрачная жидкость,  $30,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон;

7). **Стоп-раствор** (1N серная кислота), бесцветная прозрачная жидкость,  $25,0 \text{ см}^3$  – 1 флакон.

3. Набор предназначен для выявления антител к антигену *M. hyorheumoniae* в сыворотке крови свиней методом иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на исследование 92 проб сыворотки крови (в 2-х повторях). Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

4. Упаковка и маркировка

Компоненты набора расфасованы в пластиковые (стеклянные), герметично закупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) закупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоянные флаконы закупоривают резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми или пластиковыми завинчивающимися колпачками.

На флаконы (пробирки) с каждым компонентом наклеивают этикетки с указанием:

Названия и/или товарного знака организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, объема в упаковке ( $\text{см}^3$ ), номера серии, номера контроля, срока годности (мес, год).

Полистироловые планшеты упаковывают в индивидуальные полиэтиленовые пакеты. На пакеты наклеивают этикетки с указанием: названия и/или товарного знака

организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, названия адсорбированного компонента, номера серии и контроля, срока годности.

Флаконы (пробирки) с компонентами набора и планшеты упаковывают в картонные или пластиковые коробки с наличием гнезд.

На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и/или товарный знак организации-производителя и разработчика, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Срок годности компонентов набора - 12 мес от даты изготовления при условии хранения и транспортирования их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. Не допускается замораживание компонентов (кроме сывороток).

Набор не должен применяться по истечении срока годности.

6. Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета подлежат выбраковке. Микропанели и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к антигену возбудителя *M. hyorheumoniae* (конъюгат) и сывороточных специфических антител с адсорбированным в лунках иммунологического планшета антигеном *M. hyorheumoniae*.

При отсутствии в исследуемой сыворотке специфических антител, моноклональный конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным антигеном *M. hyorheumoniae*, и после добавления субстрата, в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка содержит специфические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным антигеном *M. hyorheumoniae*, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание антител конъюгата с антигеном не происходит, или происходит частично и, соответственно, окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается. Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемой сыворотке.

## III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Для проведения ИФА используют:

- одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками;

- мерную лабораторную посуду;

- дистиллированную или деионизованную воду;

- суховоздушный термостат с температурой 37°C;

- спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм;

### 9. Подготовка к исследованию

9.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови свиней (объем пробы 0,2-0,3 см<sup>3</sup>). Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 4°C не более 3-х сут, при температуре минус 20°C - до 50-60 сут. Замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают на водяной бане при температуре 37°C.

В случае выпадения осадка в пробах сыворотки крови их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Не рекомендуется исследование проросших и гемолизированных проб, а также многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови.

## 9.2. Подготовка рабочих растворов

9.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (20-25°C).

9.2.2. Рабочий раствор буфера для разведения испытуемых проб и промывания планшетов (**ФСБТ**). Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора ФСБТ к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для промывания одного стрипа требуется примерно 30 мл раствора. Рабочий раствор ФСБТ стабилен при температуре 4°C в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20°C.

9.2.3. Положительный, отрицательный контроли, конъюгат, субстрат и стоп-раствор - готовы к применению.

**ВНИМАНИЕ.** При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 120 мкл в отдельные пробирки типа Эппендорф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20°C.

Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя. Не переливать в другую посуду! Не смешивать компоненты из наборов разных серий!

## 10. Проведение анализа

10.1. В лунки планшета A1-B1 внести по 100 мкл отрицательного контроля (**K<sup>-</sup>**), в лунки C1-D1 внести по 100 мкл положительного контроля (**K<sup>+</sup>**). В остальные лунки планшета внести по 50 мкл рабочего раствора ФСБТ, подготовленного по п. 9.2.2, затем по 50 мкл каждой из испытуемых проб (в 2-х повторях), используя для каждого образца новый наконечник и тщательно перемешивая пробы.

Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать 1 ч при комнатной температуре (20 -25°C).

10.2. После окончания инкубации планшет 4 раза промыть рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 300 мкл/лунку). Затем жидкость окончательно удалить и планшет подсушить постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

**ВНИМАНИЕ.** При этой процедуре возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется перед началом работы промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

10.3. Во все используемые лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата. Планшет закрыть липкой пленкой и инкубировать 30 мин при комнатной температуре.

10.4. Планшет 6 раз промыть рабочим раствором ФСБТ (см.п. 10.2.).

10.5. Во все используемые лунки внести по 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Планшет инкубировать 10 мин при комнатной температуре в темном месте.

10.6. Реакцию остановить добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

## 11. Учет и интерпретация результатов ИФА

Учет результатов проводят сразу после остановки реакции путем измерения оптической плотности содержимого лунок на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм (**A<sub>450</sub>**).

11.1. Проводят оценку средних значений оптической плотности отрицательного (**A<sub>450K<sup>-</sup></sub>**) и положительного (**A<sub>450K<sup>+</sup></sub>**) контролей, входящих в состав набора. Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$$\begin{aligned} A_{450} K^{-} &> 0,75 \\ A_{450} K^{+} / A_{450} K^{-} &< 0,25 \end{aligned}$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют.

11.2. Рассчитывают среднее значение оптической плотности каждой пробы ( $A_{450}$  ОП), если пробы исследовали в 2-х повторях.

11.3. Вычисляют отсекающие значения (**Cut off**), необходимые для правильной интерпретации результатов

Отрицательный **Cut off** =  $0,45 \times K^{-}$

Положительный **Cut off** =  $0,40 \times K^{-}$

11.4. Полученные значения ОП позволяют дифференцировать испытуемые сыворотки на положительные, отрицательные и сомнительные.

Пробу сыворотки крови считают **положительной**, т.е. содержащей специфические антитела к *M. hyopneumoniae*, если  $A_{450}$  ОП ниже или равно значению **положительного Cut off**.

Пробу сыворотки считают **отрицательной** (специфические антитела отсутствуют), если значение  $A_{450}$  ОП выше или равно значению **отрицательного Cut off**.

Если  $A_{450}$  ОП находится между значениями **положительного и отрицательного Cut off**, пробу считают **сомнительной**. В этом случае исследование данного животного рекомендуется повторить через две недели.

#### IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

12. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

13. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

14. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим» совместно с фирмой INGENASA (Испания). Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации «ФГУ ВГНКИ».

Регистрационный номер ПВР - 1-9.9/02492