



MONOSCREEN[®] Ab ELISA

Mycoplasma bovis

Набор ИФА для серодиагностики *Mycoplasma bovis*
Непрямой ИФА для анализа сыворотки крови, плазмы и молока
Диагностический тест для крупного рогатого скота
Двойные лунки

I – ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma bovis ассоциируется со многими заболеваниями крупного рогатого скота, включая артрит, пневмонию у телят и молодняка, мастит и генитальные инфекции. Инфекционные пневмонии, которые поражают интенсивно выращиваемых телят, несут ответственность за значительные экономические потери из-за смертности, затрат на лечение и задержек роста, которые они вызывают. Эти респираторные инфекции часто включают в себя несколько факторов и вызываются взаимодействием между вирусами, микоплазмами и бактериями. Несколько видов *Mycoplasma* были выделены из дыхательных путей телят. Некоторые из них, скорее всего, являются простыми комменсалами или оппортунистическими видами, которые просто ухудшают поражение легких, вызванное другими возбудителями. *Mycoplasma bovis* была выделена из легких телят с пневмонией. Это, вероятно, самый патогенный вид, поражающий Bovidae после *Mycoplasma mycoides mycoides*. *Mycoplasma bovis* может вызывать развитие пневмонии у гнотобиотических телят. *Mycoplasma bovis* часто встречается в ассоциации с *Mannheimia haemolytica* при пневмонии у телят.

II – ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

В тесте используются 96-луночные микротитрационные планшеты, сенсibilизированные рекомбинантным белком из *Mycoplasma bovis*, экспрессируемым *E. coli*. Ген из *Mycoplasma bovis* экспрессируется этой рекомбинантной культурой *E. coli*. Нечетные столбцы планшета (1, 3, 5, 7, 9 и 11) содержат рекомбинантный белок, тогда как четные столбцы (2, 4, 6, 8, 10 и 12) содержат отрицательный контрольный антиген. Таким образом, у нас есть настоящий отрицательный контроль для дифференциации специфического антитела. Использование такого контроля значительно снижает количество ложноположительных результатов.

Тестовые сыворотки крови и плазма разбавляются в буфере для разбавления. Образцы молока используются неразбавленными. Образцы добавляются в планшет, который затем инкубируется и промывается. Конъюгат, меченый пероксидазой белка G, добавляется в лунки. Планшет инкубируется второй раз при температуре 21°C +/- 3°C. После второй инкубации планшет снова промывают и добавляют хромоген (тетраметилбензидин). Этот хромоген имеет то преимущество, что он более чувствителен, чем другие хромогены пероксидазы, и не является канцерогенным. Если в тестовых сыворотках, плазме или молоке присутствуют специфические иммуноглобулины против *Mycoplasma bovis*, конъюгат остается связанным с микролуночкой, содержащей бактериальный рекомбинантный антиген, и фермент катализирует превращение бесцветного хромогена в пигментированное соединение. Интенсивность полученного синего цвета пропорциональна титру специфического антитела в образце. Сигнал, считываемый с отрицательной контрольной микролуночкой, вычитается из сигнала положительной микролуночке, сенсibilизированной рекомбинантным белком *M. bovis*. Можно количественно оценить реактивность неизвестного образца по шкале от 0 до +++++.

III – СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшеты:** 96-луночные микротитрационные планшеты (6 полосок по 16 лунок). Нечетные столбцы (1, 3, 5, 7, 9 и 11) сенсibilизированы рекомбинантным *M. bovis*, а четные столбцы (2, 4, 6, 8, 10 и 12) - отрицательным контрольным белком.

- **Промывочный раствор:** одна бутылка 20-кратного концентрированного промывочного раствора. Раствор самопроизвольно кристаллизуется при охлаждении. Если необходимо использовать только часть раствора, доведите бутылку до 21 °С +/- 3 °С, пока все кристаллы не исчезнут. Тщательно перемешайте раствор и отберите необходимый объем. Разбавьте буфер 1:20 дистиллированной или деминерализованной водой.

- **Буфер для разбавления:** одна бутылка 5-кратного концентрированного буфера для разбавления сыворотки крови, плазмы и конъюгата. Содержимое бутылки следует разбавить дистиллированной или деминерализованной водой. Если на дне емкости образуется осадок, отфильтруйте раствор на фильтровальной бумаге Whatman.

- **Конъюгат:** один флакон белка G, меченого пероксидазой хрена.

- **Положительный эталон:** один флакон положительной сыворотки. Храните этот реагент при температуре от +2°С до +8°С.

- **Отрицательный эталон:** один флакон отрицательной сыворотки. Храните этот реагент при температуре от +2°С до +8°С.

- **Трейсер:** один флакон трейсера. Храните этот реагент при температуре от +2°С до +8°С.

Трейсер — это эталонный образец, который можно использовать для проверки внутрилабораторной воспроизводимости партии набора.

Внутрилабораторная воспроизводимость: степень соответствия результатов повторных испытаний одного и того же образца с идентичным техническим протоколом в данной лаборатории при различных рабочих условиях.

- **Однокомпонентный ТМБ:** один флакон хромогена тетраметилбензидина (ТМБ). Храните при температуре от +2°С до +8°С в защищенном от света месте. Этот раствор готов к использованию.

- **Стоп-раствор:** Одна бутылка стоп-раствора фосфорной кислоты 1 М.

	БИО К 260/2	БИО К 260/5
Микропланшеты	2	5
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20X)	1 x 250 мл (20X)
Буфер для разведения	1 x 30 мл (5X)	1 x 100 мл (5X)
Конъюгат	1 x 0,5 мл (50X)	1 x 1,4 мл (50X)
Положительная сыворотка	1 x 0,5 мл (1X)	1 x 0,5 мл (1X)
Отрицательная сыворотка	1 x 0,5 мл (1X)	1 x 0,5 мл (1X)
Референсный образец	1 x 0,5 мл (1X)	1 x 0,5 мл (1X)
Однокомпонентный ТМБ	1 x 25 мл (1X)	1 x 55 мл (1X)
Стоп-раствор	1 x 15 мл (1X)	1 x 30 мл (1X)

IV – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, стаканы, пластиковые пробирки, штатив для пробирок, микропланшеты для разбавления, наконечники для дозатора, резервуар для реагентов для многоканальных пипеток, крышка, клей для микропланшетов, градуированные автоматические (одно- и многоканальные) пипетки, считыватель микропланшетов, а также промыватель и шейкер для микропланшетов (опционально).

V – МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

- Этот тест можно использовать только для диагностики «in vitro». Он предназначен исключительно для ветеринарного использования.

- Реагенты должны храниться при температуре от +2°С до +8°С. Реагенты не могут быть гарантированы, если срок годности истек или если они не хранились в условиях, описанных в этом вкладыше.

- Концентрированный промывочный раствор и буфер для разбавления можно хранить при комнатной температуре. После разбавления эти растворы остаются стабильными в течение шести недель, если их хранить при температуре от +2°С до +8°С.

- Неиспользованные полоски необходимо немедленно поместить в алюминиевый конверт, следя за тем, чтобы осушитель оставался сухим, а герметичность конверта была герметичной. Если принять эти меры предосторожности, активность полосок может сохраняться до истечения срока годности набора.

- Не используйте реагенты из других наборов.

- Качество воды, используемой для приготовления различных растворов, имеет первостепенное значение. Не используйте воду, которая может содержать окислители (например, гипохлорит натрия) или соли тяжелых металлов, так как эти вещества могут реагировать с хромогеном.

- Утилизируйте все растворы, загрязненные бактериями или грибами.

- Стоп-раствор содержит 1 М фосфорной кислоты. Обращайтесь с ним осторожно.

- Все материалы и одноразовое оборудование, которые контактируют с образцами, должны считаться потенциально инфекционными и утилизироваться в соответствии с действующим в стране законодательством.

- Чтобы гарантировать надежность результатов, необходимо следовать протоколу до последней буквы. Особое внимание следует уделять соблюдению времени и температуры инкубации, а также точному измерению объемов и разведений.

VI – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1- Доведите все компоненты до 21°C +/- 3°C перед использованием. Извлеките микропланшет из упаковки.

2- РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

2.1- Подготовка сыворотки и плазмы крови

Образцы сыворотки и плазмы крови необходимо разбавить 1:100. Избегайте использования гемолизированных образцов или образцов, содержащих коагулу.

2.1.1- Разведение в пробирках

Распределите аликвоты по 990 мкл буфера для разбавления, приготовленного в соответствии с инструкциями в разделе «Состав набора», по пробиркам объемом 5 или 10 мл. Добавьте аликвоты по 10 мкл образцов в каждую из этих пробирок и быстро перемешайте на механической мешалке (конечное разбавление: 1:100).

2.1.2- Разведение на микропланшете

Распределите аликвоты по 20 мкл каждого из образцов по микролункам планшета для разбавления. Добавьте 180 мкл буфера для разбавления. Перемешайте пять раз путем прокачивания и встряхивания или орбитального перемешивания (разбавление: 1:10). Распределите 90 мкл аликвот буфера для разбавления в лунки микропланшета набора. Перенесите 10 мкл предварительно разведенных 1:10 образцов. Перемешайте пять раз путем прокачивания и встряхивания или орбитального перемешивания (конечное разбавление: 1:100).

2.2- Разбавление контрольных сывороток набора (положительный и отрицательный контроль) и трейсера

Положительная и отрицательная сыворотки и трассер должны быть разведены 1:100. Сделайте эти разбавления в один этап в пробирке (см. пункт 2.1.1.) или в два этапа на микропланшете для разбавления (см. пункт 2.1.2.).

2.3- Подготовка молока

Центрифугируйте при 4000 g в течение 20 минут. Возьмите средний слой жидкости с помощью стеклянной пипетки Пастера, вставленной в верхний слой сливок, стараясь не касаться нижележащего клеточного осадка.

Используйте неразбавленные образцы обезжиренного молока в лунках.

3- Распределите образцы (сыворотку крови, плазму или молоко), используя 100 мкл на лунку. Например, можно следовать следующей схеме: Положительная сыворотка в лунках A1 и A2, Отрицательная сыворотка в лунках B1 и B2, Трейсер в лунках C1 и C2, Образец 1 в лунках D1 и D2 и т. д. Закройте планшет крышкой и инкубируйте при температуре 21° ± 3°C в течение одного часа.

4- Промойте планшет промывочным раствором, приготовленным в соответствии с инструкциями в разделе «Состав набора». Для этого утилизируйте содержимое микропланшета, резко перевернув его над контейнером, наполненным инактивирующим агентом. Дайте микропланшету стечь вверх дном на листе чистой впитывающей бумаги, чтобы удалить всю жидкость. Добавьте 300 мкл промывочного раствора, а затем снова опорожните планшет, перевернув его над контейнером для хранения. Повторите всю операцию еще два раза, уделяя особое внимание тому, чтобы избежать образования пузырьков в лунках. После этих трех промываний переходите к следующему шагу.

Также рекомендуется использовать промыватель планшетов (автоматический или ручной). Однако глубина погружения игл должна быть установлена таким образом, чтобы не нарушить слой реагентов, адсорбированных на дне каждой лунки.

5- Разбавьте конъюгат 1:50 в буфере для разбавления (например, для одной пластины разбавьте 250 мкл исходного раствора конъюгата в 12,250 мл разбавителя). Добавьте 100 мкл разбавленного раствора конъюгата в каждую лунку. Накройте пластину крышкой и инкубируйте в течение одного часа при температуре 21 °C +/- 3 °C.

6- Промойте пластину, как описано выше.

7- Добавьте 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку на пластине. Раствор хромогена должен быть абсолютно бесцветным, когда его пипетируют в лунки. Если виден синий цвет, это означает, что раствор в пипетке был загрязнен.

8- Инкубируйте в течение 10 минут при температуре 21°C +/- 3°C, защищенном от света и открытым. Это время указано только в качестве ориентира, поскольку в некоторых обстоятельствах может быть полезно увеличить или сократить время инкубации.

9- Добавьте 50 мкл стоп-раствора на микролунку. Синий цвет изменится на желтый.

