



MULTISCREEN Ag ELISA

Вирусы желудочно-кишечного тракта

Набор ИФА для антигенной диагностики ротавируса, коронавируса,
E. Coli с адгезивным фактором F5 и *Cryptosporidium*
ИФА сэндвич-типа для анализа фекалий
Диагностический тест для крупного рогатого скота

I – ВВЕДЕНИЕ

Диарея является основной причиной смертности телят в первый месяц жизни. Гастроэнтерит новорожденных особей крупного рогатого скота часто является многофакторным заболеванием. Это может быть вызвано вирусами (коронавирус или ротавирус), бактериями (сальмонелла или кишечная палочка F5) или простейшими микроорганизмами, такими как *Cryptosporidium*. Диагноз диареи может быть поставлен только в лаборатории, поскольку невозможно дифференцировать эти различные микроорганизмы на основании клинических признаков. Метод ИФА прост в использовании, не требует большого количества оборудования и особенно хорошо подходит для анализа большого количества образцов. Тест быстрый и надежный, и его можно оценить невооруженным глазом, если спектрофотометрическое оборудование недоступно.

II – ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

В этом тесте планшет для микротитрования сенсibiliзируется смесью антител, специфичных к четырем патогенам (см. диаграмму в конце инструкции). Эти антитела захватывают соответствующие патогены в образцах фекалий. Фекальный материал разбавляют буфером для разбавления и инкубируют на микропланшете в течение 30 минут при $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Положительный и отрицательный контроли также наносятся на планшет.

Планшет инкубируют и промывают, а затем в лунки добавляют готовые к использованию конъюгаты. Выбор конъюгатов остается за пользователем. На схеме ниже показан пример расположения образцов и конъюгатов на планшете.

После второй инкубации в течение 30 минут при $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ планшет снова промывают и добавляют хромоген тетраметилбензидин (ТМВ). Этот хромоген имеет два преимущества: он более чувствителен, чем другие хромогены пероксидазы, и не является канцерогенным. Если один или несколько искомым возбудителей присутствуют в фекалиях, соответствующие конъюгаты остаются связанными с соответствующими микрочайками, и фермент катализирует превращение бесцветного хромогена в соединение синего цвета. Интенсивность полученного цвета пропорциональна титру возбудителя в образце.

Схема расположения образцов

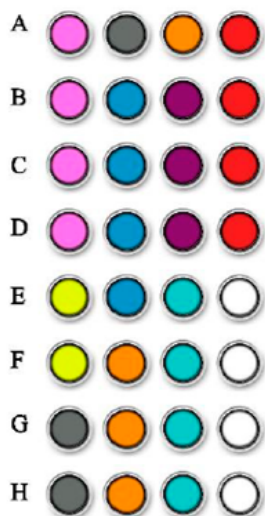
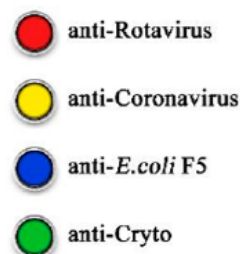
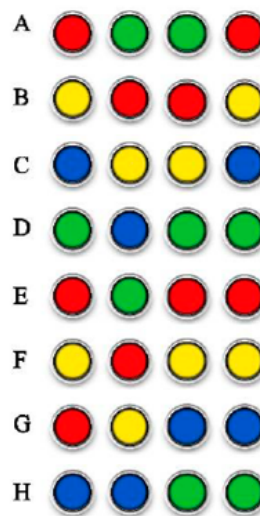


Схема расположения конъюгата



III – СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшет:** Один 96 – луночный микротитровальный планшет. Планшет сенсibilизирован моноклональными антителами, чувствительными к 4 патогенам.

- **Промывочный раствор:** один 100-мл флакон моющего буфера концентрации 20х. При пониженной температуре раствор кристаллизуется. Если необходимо использовать только часть раствора, флакон необходимо согреть до комнатной температуры, чтобы все кристаллы растворились. Раствор необходимо перемешать и затем отобрать необходимый объем. Буфер разводится дистиллированной или деионизированной водой в пропорции 1:20. Разведенный буфер можно хранить при температуре +4 °С.

- **Буфер для разведения:** один 50 мл флакон буфера (концентрация 5х) для разведения проб. Разведите буфер в соотношении 1:5 дистиллированной или деионизированной водой. Буфер можно хранить при температуре +4 °С. При появлении осадка буфер необходимо профильтровать через фильтровальную бумагу.

- **Конъюгат:** четыре 12 мл флакона окрашенного конъюгата. Специфичность каждого конъюгата указана на флаконе. Реагент готов к использованию.

- **Положительный контроль:** один флакон 3 мл положительного контроля. Реагент готов к использованию.

- **Отрицательный контроль:** один флакон 3 мл отрицательного контроля. Реагент готов к использованию.

- **Хромоген:** один флакон хромогена - тетраметилбензидин. Хранить при 4°С в защищенном от света месте. Реагент готов к использованию.

- **Стоп-реагент:** один флакон 1М фосфорной кислоты. Реагент готов к использованию.

	БИО К 151/1	БИО К 151/2
Микропланшет	1	2
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20X)	1 x 250 мл (20X)
Буфер для разведения (подкрашенный)	1 x 50 мл (5X)	1 x 50 мл (5X)
Конъюгат	4 x 12 мл (1X)	4 x 12 мл (1X)
Положительный контроль	1 x 3 мл (1X)	1 x 3 мл (1X)
Отрицательный контроль	1 x 3 мл (1X)	1 x 3 мл (1X)
Однокомпонентный ТМБ	1 x 12 мл (1X)	1 x 25 мл (1X)
Стоп-раствор	1 x 6 мл (1X)	1 x 15 мл (1X)

IV - НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, химические стаканы, пластиковые пробирки, штатив для пробирок, наконечники дозаторов, резервуар для реагентов для многоканальных пипеток, крышка, клей для микропланшетов, градуированные автоматические (моно- и многоканальные) пипетки, устройство для считывания микропланшетов, устройство для промывки и шейкер микропланшетов (дополнительно).

V - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

- Этот тест можно использовать только для диагностики «in vitro» и строго для ветеринарного использования.

- Реагенты должны храниться при температуре от +2°C до +8°C. Гарантия на реагенты не действует, 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 при температуре от +2°C до +8°C.

- Неиспользованные стрипы следует хранить в алюминиевом конверте, следя за тем, чтобы влагопоглотитель оставался сухим, а конверт герметично закрывался. При соблюдении этих мер предосторожности активность полосок может сохраняться до окончания 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, зараженные бактериями или грибами.

- Стоп-раствор содержит 1 М фосфорную кислоту. Обращайтесь с ним осторожно.

- Все материалы и одноразовое оборудование, контактировавшие с образцами, должны считаться потенциально инфицированными и утилизироваться в соответствии с действующим в стране законодательством.

- Чтобы гарантировать достоверность результатов, необходимо строго следовать протоколу. Особое внимание следует уделить соблюдению времени и температуры инкубации, а также точному измерению объемов и разведений.

VI – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1- Доведите все реагенты до температуры 21°C±3°C перед использованием.

2- Пробы кала разводят буфером для разведения в соотношении 1:1. Это только качественное разведение, обеспечивающее внесение растворов кала. Осадок отбрасывается после сцеживания приблизительно через 10 минут. Не центрифугируйте смесь!

3- Извлеките микропланшет из упаковки.

4- В лунки планшета вносятся по 100 мкл разведенных проб. При внесении различных проб необходима смена наконечников пипет-дозатора. В лунки вносят положительный и отрицательный контроль (по одной лунке на исследуемую валентность). Контрольные растворы готовы к использованию. Если распределение проб и конъюгатов сложное, сделайте собственную схему.

6- Планшет промывается моющим буфером, приготовленным в соответствии с п.2 инструкции, следующим образом: жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках, удаляют путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. В лунки вносится по 300 мкл моющего буфера. После этого жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках, удаляют путем энергичного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Данный процесс повторяют еще дважды.

7- В каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгатов.

8- Планшет инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре

9- Планшет промывают в соответствии с описанием в п.6.

10- В каждую лунку вносят по 100 мкл хромогена. Во время внесения хромогена в лунки планшета он должен быть совершенно бесцветным. Появление голубого оттенка на этом этапе означает загрязнение раствора в пипет-дозаторе.

11- Планшет инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре, не закрывая его, вдали от света.

12- Результат может быть интерпретирован при появлении голубой окраски, если нет необходимости в считывании результатов с помощью фотометра. При использовании фотометра данный этап пропускают и останавливают развитие реакции внесением стоп-реагента.

13- В каждую лунку вносят по 50 мкл стоп-реагента. Голубая окраска содержимого лунки изменится на желтый цвет.

14- На микропланшетном фотометре, используя фильтр 450 нм, измеряют оптическую плотность в каждой лунке. Измерение результатов должно производиться максимально быстро после внесения стоп-реагента, т.к. при взаимодействии хромоген может кристаллизоваться и привести к ухудшению сигнала и соответственно к неверным результатам.

VII – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

После измерения оптической плотности с помощью фотометра рассчитывают истинное значение оптической плотности, вычитая из измеренного значения оптической плотности пробы значение соответствующего отрицательного контроля.

Такой же расчет проводится для положительного контроля.

Результаты теста считаются достоверными, если положительная сыворотка показывает в течение 10 минут разницу большую, чем значение, указанное в сертификате качества:

Rotavirus	> 1,000
Coronavirus	> 1,000
E. coli F5	> 1,000
Cryptosporidium	> 1,000

Далее разделите оптическую плотность, считанную для каждой лунки образца, на соответствующую положительную оптическую плотность и умножьте этот результат на 100, чтобы выразить его в процентах.

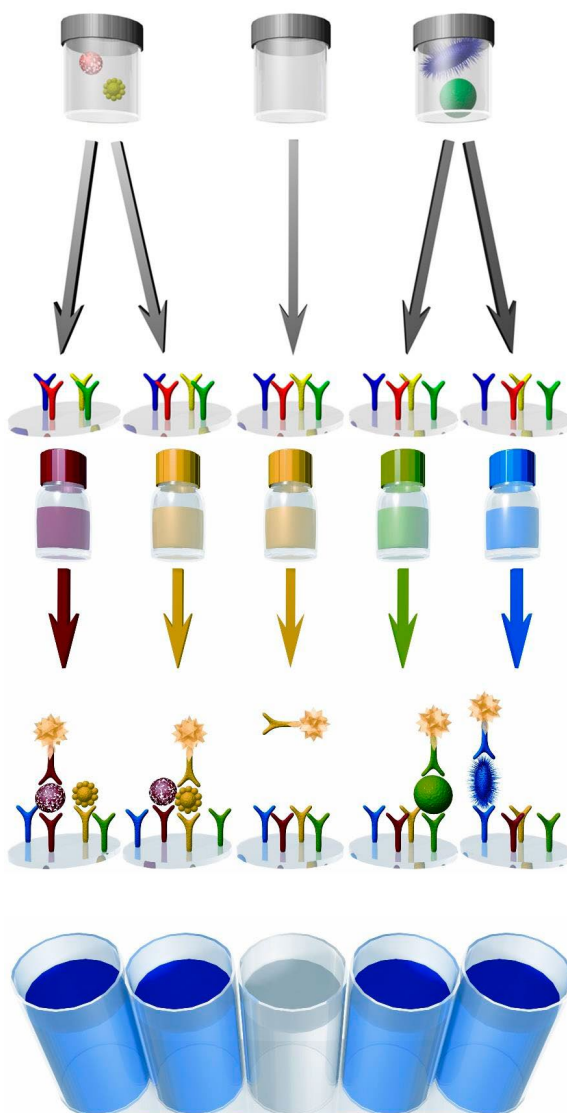
$$\text{Результат} = \frac{\Delta OD \text{ образца} \cdot 100}{\Delta OD \text{ положительного контроля}}$$

Используя следующую таблицу, определите статус каждого образца (положительный, отрицательный):

Rotavirus	$\geq 6,00\%$
Coronavirus	$\geq 7,00\%$
E. coli F5	$\geq 6,00\%$
<i>Cryptosporidium</i>	$\geq 6,00\%$

Любой образец, у которого оптическая плотность больше или равна вышеприведенным процентам, считается положительным. И наоборот, любой образец, у которого оптическая плотность меньше, чем вышеуказанные проценты, считается отрицательным.

При визуальной интерпретации (голубой окраски), пробы, голубая окраска которых более интенсивная, чем окраска соответствующего отрицательного контроля, интерпретируются как положительные.



VIII – ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Multiscreen AgELISA Calf digestive

:

1 X 96 тестов

2 X 96 тестов

BIO K 151/1

BIO K 151/2

Поставщик в Беларусь:

ОДО «КомПродСервис»
ул. Филимонова, 25Г, пом. 1000, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка:
support@komprod.com
+375 17 336 50 54



Поставщик в Россию:

ООО «Неотест»
ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www. neo-test.ru

Техническая поддержка:
support@neo-test.ru
+7 499 704 05 50

