



MULTISCREEN Ag ELISA

Вирусы желудочно-кишечного тракта

Набор ИФА для антигенной диагностики ротавируса и коронавируса
Сэндвич-тест для анализа фекалий
Диагностический тест для телят

I – ВВЕДЕНИЕ

Диарея является основной причиной смертности у телят в течении первого месяца жизни. Бычий неонатальный гастроэнтерит часто является многофакторным заболеванием. Это может быть вызвано вирусами (коронавирус или ротавирус), бактериями (сальмонелла или *E.coli* F5) или протозойскими микроорганизмами, такими как *Cryptosporidium*. Диагноз этиологического агента диареи может быть поставлен только в лаборатории, поскольку невозможно различить эти микроорганизмы на основе клинических признаков. Техника ИФА проста в использовании, не требует специального оборудования и хорошо подходит для анализа большого количества образцов. Тест быстрый и надежный; результаты можно оценить визуально, если спектрофотометрическое оборудование недоступно.

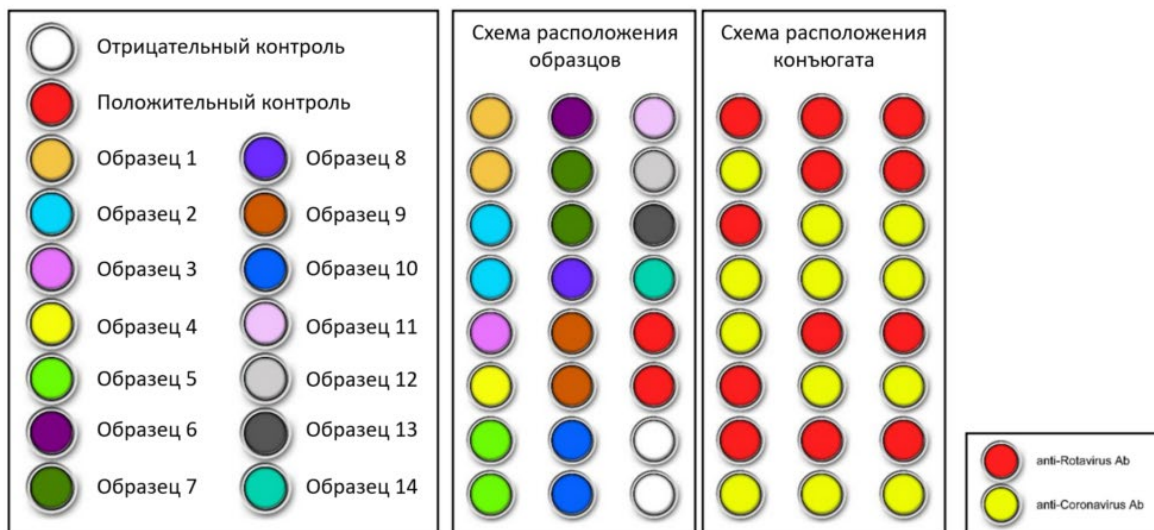
II – ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

В этом тесте микротитрационный планшет сенсibiliзируется смесью антител, которые специфичны для 2 патогенных микроорганизмов (см. Диаграмму на последней странице). Эти антитела захватывают соответствующие патогены в образцах фекалий.

Образцы фекалий разбавляются и инкубируются на микропланшете в течение 1/2 часа при $21^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Положительный и отрицательный контроль также наносятся на планшет.

Планшет инкубируется и промывается, а затем готовые к использованию конъюгаты добавляются в лунки. Конъюгаты вы можете выбрать самостоятельно. Схема ниже – это пример расположения образцов и конъюгатов на планшете.

После второй инкубации в течение 1/2 часа при $21^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ планшет снова промывается и добавляется хромогентетраметилбензидин (ТМВ). Этот хромоген имеет два преимущества: он более чувствительный, чем другие хромогены пероксидазы, и не является канцерогенным. Если в фекалиях присутствует один или несколько исследуемых патогенов, соответствующие конъюгаты остаются связанными с соответствующими микролунками, а фермент катализирует трансформацию бесцветного хромогена в синее соединение. Интенсивность полученного цвета пропорциональна титру патогена в образце.



III – СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшет:** Один 96 – луночный микротитровальный планшет. Планшет сенсibilизирован моноклональными антителами, чувствительными к 3 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 +2-+8 °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 +2-+8 °С. При появлении осадка буфер необходимо профильтровать через фильтровальную бумагу.

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

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

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

- **Хромоген:** один флакон хромогена - тетраметилбензидин. Хранить при +2-+8°C в защищенном от света месте. Реагент готов к использованию.

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

	БИО К 314/1
Микропланшет	1 шт.
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20X)
Буфер для разведения (подкрашенный)	1 x 50 мл (1X)
Конъюгаты	2 x 12 мл (1X)
Положительная сыворотка	1 x 3 мл (1X)
Отрицательная сыворотка	1 x 3 мл (1X)
Однокомпонентный ТМБ	1 x 12 мл (1X)
Стоп-реагент	1 x 6 мл (1X)

IV - НЕОБХОДИМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, стаканы, пластиковые трубки, наконечники дозатора, резервуар реагентов для многоканальных пипеток, крышки, клей для микропланшетов, градуированные автоматические (моно- и многоканальные) пипетки, считыватели микропланшетов и микроплантационная стирка и шейкер (необязательно).

V - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

- Этот тест можно использовать только для диагностики *in vitro* и строго для ветеринарии.
- Реагенты должны храниться при температуре от +2°C до +8°C. Производитель не гарантирует правильность работы реагентов, если срок годности истек или если они не хранились в условиях, описанных в этом вкладыше.
- Концентрированный промывочный раствор можно хранить при комнатной температуре. После разбавления этот раствор остается стабильным в течение 6 недель при температуре от +2°C до +8°C.
- Неиспользованные стрипы следует хранить в алюминиевом пакете, следя за тем, чтобы влагопоглотитель оставался сухим, а пакет герметично закрытым. При соблюдении этих мер предосторожности активность стрипов 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.
- Для получения надежных результатов, необходимо строго следовать протоколу. Особое тщательно необходимо следить за временем и температурой инкубации, а также точно измерять объемы и рассчитывать разбавления.

VI – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 1- Доведите температуру всех реагентов до 21°C±3°C перед использованием.
- 2- Разбавьте образцы фекалий 1:1 буфером для разбавления. Это только качественное разбавление, которое обеспечивает пипетирование фекальных суспензий. Осадок отбрасывается после сцеживания приблизительно через 10 минут. Не центрифугируйте суспензию.
- 3- Микропланшет освобождают от 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.
- 5- Накройте планшет и инкубируйте при 21±3°C в течение 1/2 часа.
- 6- 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- Накройте планшет и инкубируйте при $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 1/2 часа.

9- Промойте планшет, как указано на шаге 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:

Ротавирус	>1.000
Коронавирус	>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):

Ротавирус	$\geq 6.00\%$
Коронавирус	$\geq 7.00\%$

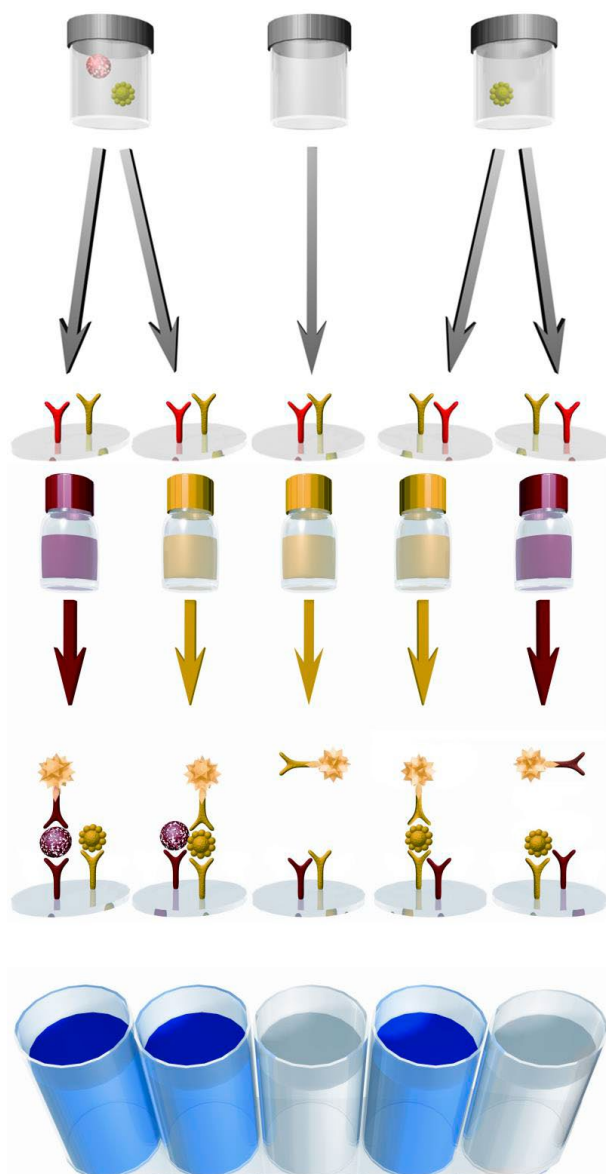
Любой образец, у которого оптическая плотность больше или равна вышеприведенным процентам, считается положительным. И наоборот, любой образец, у которого оптическая плотность меньше, чем вышеуказанные проценты, считается отрицательным.

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

BIO K 314/1



Официальный дистрибьютор в Беларуси:

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 России:

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

