



MULTISCREEN Ag ELISA

Заболевания ЖКТ телят

ИФА для антигенной диагностики ротавирусов и коронавирусов

ИФА сэндвич-типа для анализа фекалий

Диагностический тест для телят

I – ВВЕДЕНИЕ

Диарея является одной из основных причин смертности молодняка крупного рогатого скота в возрасте до одного месяца.

Гастроэнтерит новорожденных телят крупного рогатого скота является многофакторным заболеванием. Это может быть вызвано вирусами: ротавирусом или коронавирусом; бактериями: сальмонеллой или кишечной палочкой F5; или простейшими микроорганизмами, такими как *Cryptosporidium*.

Диагностировать этиологический агент диареи можно только в лаборатории, так как клинические признаки не позволяют дифференцировать разные микроорганизмы. Эти агенты можно идентифицировать с помощью различных методов культивирования и флотации, включая окрашивание. Однако эти методы трудоемки и непрактичны.

Эти классические методы были заменены технологией ИФА из-за простоты выполнения анализа.

Чувствительность и специфичность метода ИФА для обнаружения этих патогенов, сравнимы с характеристиками классических методов, результаты анализов очень похожи. Метод ИФА является быстрым и надежным и особенно подходит для анализа большого количества образцов.

II - ПРИНЦИП РАБОТЫ

В тесте используются 96-луночные микротитровальные планшеты, сенсibilизированные специфическими антителами к коронавирусу и ротавирусу. Эти антитела позволяют специфически захватывать соответствующие патогены, присутствующие в образцах фекалий. Ряды А, С, Е и G были сенсibilизированы этими антителами, а ряды В, D, F и H содержат неспецифические антитела. Эти контрольные ряды позволяют различать специфическую иммунологическую реакцию и неспецифическое связывание.

Фекалии разводят буфером для разведения и инкубируют на микропланшете в течение 1 часа при 21°C +/- 3°C.

После первой стадии инкубации планшет промывают и инкубируют в течение 1 часа с конъюгатами, меченым пероксидазой моноклональным антителом, специфичным к ротавирусу, и меченым пероксидазой моноклональным антителом, специфичным к коронавирусу. После второй инкубации планшет снова промывают и добавляют хромоген (тетраметилбензидин). Этот хромоген имеет преимущество: он более чувствителен, чем другие хромогены пероксидазы, и не является канцерогенным.

Если в тестируемых фекалиях присутствует коронавирус или ротавирус, конъюгаты остаются связанными с соответствующими микролуночками, а фермент катализирует превращение бесцветного хромогена в пигментированное соединение. Интенсивность полученного синего цвета пропорциональна титру коронавируса или ротавируса в образце. Комбинированное заражение как коронавирусом, так и ротавирусом также может быть выявлено. Ферментативную реакцию можно остановить подкислением, а результирующую оптическую плотность при 450 нм можно зарегистрировать с помощью фотометра. Сигналы, записанные для микролунок отрицательного контроля, вычитают из соответствующих микролунок положительного контроля. Положительный контроль предоставляется вместе с набором для подтверждения результатов теста.

III – СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшеты:** два 96-луночных планшета для микротитрования. Ряды А, С, Е, G сенсбилизированы специфическими антителами, ряды В, D, F, H - неспецифическими антителами.

Ряд А: anti-Rotavirus

Ряд В: Контроль

Ряд С: anti-Coronavirus

Ряд D: Контроль

Ряд Е: anti-Rotavirus

Ряд F: Контроль

Ряд G: anti-Coronavirus

Ряд H: Контроль

- **Промывочный раствор:** один флакон объемом 100 мл с 20-кратным концентрированным промывочным раствором. Раствор самопроизвольно кристаллизуется при охлаждении. Если необходимо использовать только часть раствора, доведите температуру бутылки до 21°C +/- 3°C до исчезновения всех кристаллов. Хорошо перемешайте раствор и отберите из флакона необходимый объем. Разбавьте буфер 1:20 дистиллированной или деминерализованной водой.

- **Буфер для разбавления:** один флакон объемом 50 мл с 5-кратно концентрированным и окрашенным буфером для разбавления образцов. Разбавьте концентрированный буфер в соотношении 1:5 дистиллированной или деминерализованной водой. Если на дне контейнера образуется осадок, отфильтруйте раствор через фильтровальную бумагу Whatman.

- **Конъюгаты:** два флакона по 12 мл с окрашенными конъюгатами. Эти растворы готовы к использованию. Ротавирус (красный), коронавирусу (желтый).

- **Положительный контроль:** 1 флакон объемом 4 мл. Реагент готов к использованию.

- **Однокомпонентный ТМВ:** Один флакон хромогена тетраметилбензидина (ТМВ) объемом 25 мл. Хранить при температуре от +2°C до +8°C в защищенном от света месте. Раствор готов к использованию.

- **Стоп-раствор:** один флакон объемом 15 мл 1M фосфорной кислоты.

	БИО К 347/2
Микропланшеты	2
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20X)
Буфер для разведения, окрашенный	1 x 50 мл (5X)
Конъюгаты	2 x 12 мл (1X)
Контрольный антиген	1 x 4 мл (1X)
Однокомпонентный ТМВ	1 x 25 мл (1X)
Стоп-раствор	1 x 15 мл (1X)

IV – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

V – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Этот тест можно использовать только для диагностики «*in vitro*». Строго для ветеринарного использования.

- Реагенты должны храниться при температуре от +2°C до +8°C. Гарантия на реагенты не действует после истечения срока годности или если они не хранились в условиях, описанных в инструкции.

- 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 алюминиевой упаковке. В упаковке обязательно должен быть влагопоглотитель, а сама упаковка герметично закрыта. 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.

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

VI – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

2- Разбавьте концентрированный промывочный раствор в 20 раз дистиллированной водой. Перед разбавлением убедитесь, что в растворе нет кристаллы. Разбавьте концентрированный буфер для разбавления в 5 раз дистиллированной водой. Храните эти растворы при температуре от +2°C до +8°C, после анализа.

3- Разбавьте образцы фекалий по объему в буфере для разбавления, приготовленном в соответствии с инструкциями на шаге 2.

Это только качественное разведение, которое должно позволять пипетирование фекальных суспензий. Избавьтесь от любых примесей естественным декантированием в течение примерно 10 минут. Не центрифугируйте суспензии.

4- Добавьте аликвоты разведенных образцов по 100 мкл в лунку следующим образом: образец 1 в лунки от E1 до H1, образец 2 в лунки от A2 до D2 и т. д. Действуйте таким же образом для положительного контроля: напр., от A1 до D1

5- Накройте крышкой и инкубируйте планшет при 21°±3°C в течение одного часа.

6- Промойте планшет промывочным раствором, приготовленным в соответствии с инструкциями в разделе «Состав набора». Для этого вылейте 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 моющего раствора и снова опорожните планшет, перевернув его над защитным сосудом. Повторите всю операцию еще два раза, стараясь избежать образования пузырьков в микролунках. После трехкратной промывки планшета переходите к следующему шагу.

7- Добавьте по 100 мкл раствора конъюгата на лунку.

анти-ротавирус (красный): ряды A, B, E и F

анти-Коронавирус (желтый): ряды C, D, G и H.

Накройте крышкой и инкубируйте планшет при 21°±3°C в течение одного часа.

8- Промойте планшет, как описано в шаге 6.

9- Добавьте по 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку планшета. Раствор хромогена должен быть абсолютно бесцветным при пипетировании в лунки. Если виден синий цвет, это означает, что раствор в пипетке был загрязнен.

Инкубируйте при 21°C +/- 3°C в темном месте в течение 10 минут. Не накрывайте планшет. Этот временной интервал дается только в качестве рекомендации, так как в некоторых случаях может быть полезно увеличить или сократить время инкубации.

10- Добавьте в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора. Синий цвет изменится на желтый цвет.

11- Считайте оптическую плотность с помощью спектрофотометра для микропланшетов с фильтром 450 нм. Результаты должны быть прочитаны как можно быстрее после добавления стоп-раствора, так как хромоген может кристаллизоваться и влиять на правильность результатов.

VII – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте оптическую плотность для каждого образца, вычитая из показаний для каждой лунки образца оптическую плотность соответствующей отрицательной лунки.

Действуйте таким же образом для положительного контроля.

Тест считается валидированным только в том случае, если выполняется условие: измерить оптическую плотность положительного контрольного антигена, затем повторить измерение через 10 минут; разница этих значений не превышает значения валидации, указанные в паспорте контроля качества.

Разделите каждое полученное значение на соответствующее значение, полученное для соответствующего положительного контроля, и умножьте этот результат на 100, чтобы выразить его в процентах.

$$\text{значение} = \frac{\text{Дельта ОП образца} \times 100}{\text{Дельта ОП положительного контроля}}$$

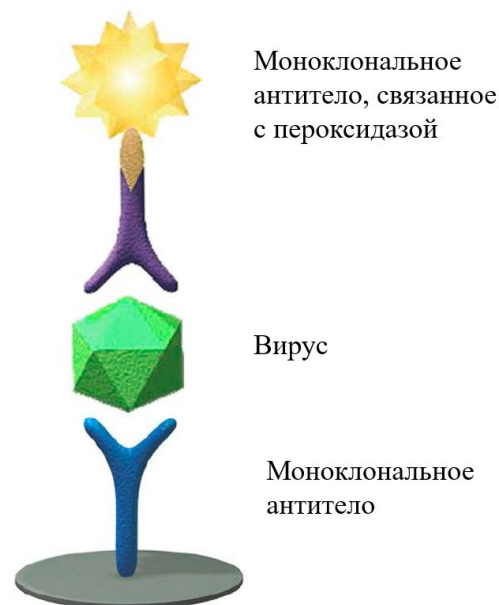
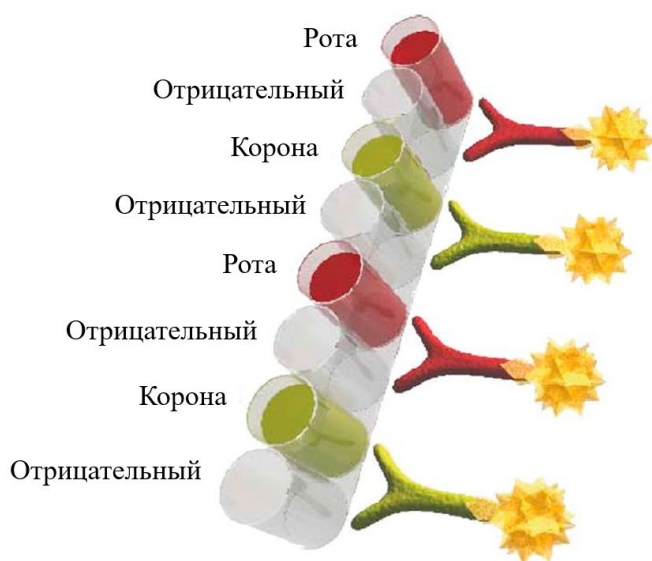
Используя первую таблицу из процедуры контроля качества, определите статус каждого образца (положительный, отрицательный).

VIII – ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Multiscreen AgELISA Calf digestive:

2 x 24 образца

BIO K 347/2



Официальный дистрибьютор в Беларуси:

ОДО «КомПродСервис»

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка:

+375 17 336 50 54

support@komprod.com



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:

+7 499 704 05 50

support@neo-test.ru

