



# MULTISCREEN Ag ELISA

## Телячья дигестия

ИФА-набор для диагностики антигена ротавируса, коронавируса,  
бактериального фактора роста *E. Coli* F5 и криптоспоридий

Сэндвич-тест для анализа кала

Диагностический тест для телят

БИО-К 348/2 (2 планшета)

БИО К 348/5 (5 планшетов)

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Диарея является основной причиной смертности молодняка крупного рогатого скота в возрасте до одного месяца. Неонатальный гастроэнтерит крупного рогатого скота – это многофакторное заболевание. Он может быть вызван вирусами (коронавирус или ротавирус), бактериями: (*Salmonella*, патогенные штаммы *E. coli*) или простейшими, такими как *Cryptosporidium*.

Коронавирус и ротавирус часто связаны с эпизодами неонатальной диареи. *Cryptosporidium* также часто выделяют из кала, где он может присутствовать в очень больших количествах. F5-положительная энтеротоксигенная кишечная палочка часто выделяется у телят в возрасте до трех дней, особенно у телят, лишенных колюструма, или у телят, которых кормили колюструмом, не содержащим специфических антител против *E. coli* F5 +.

Диагностика этиологического агента диареи может быть проведена только в лаборатории, поскольку клинических признаков недостаточно, чтобы отличить эти разновидности микроорганизмов. Идентифицировать этих возбудителей можно с помощью различных методов, включая посева, окрашивание, электронную микроскопию и методы флотации. Однако эти методы трудоемки, непрактичны и отнимают много времени.

На смену этим классическим методам пришла технология ИФА из-за ее простоты и минимальных требований к лабораторному оборудованию.

Чувствительность и специфичность метода ИФА для выявления этих патогенов, по крайней мере, не хуже, чем у традиционного метода, а результаты очень похожи. Метод ИФА является быстрым и надежным и особенно подходит для анализа большого количества образцов.

## 2. ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА

На чередующихся рядах 8×12-луночных микротитровальных планшетов были иммобилизованы специфические антитела против патогенов, вызывающих заболевания органов пищеварения. Эти антитела позволяют специфически захватывать соответствующие патогены в образцах фекалий. Ряды А, С, Е, G были сенсibilизированы этими антителами, а ряды В, D, F, H содержат неспецифические антитела. Эти ряды позволяют дифференцировать специфические иммунологические реакции от неспецифического связывания, чтобы исключить ложноположительные результаты.

Образцы кала разводятся в буфере для разведения и инкубируются на микропланшете в течение 1 часа при температуре 21°C +/- 3°C.

После первого этапа инкубации планшет промывают, а затем в лунки добавляют конъюгаты – меченные пероксидазой антипатогенные моноклональные антитела. Затем планшет инкубируется в течение 1 часа при 21°C +/- 3°C.

После второго этапа инкубации планшет снова промывают и добавляют хромоген (тетраметилбензидин). Преимущество этого хромогена в том, что он более чувствителен, чем другие пероксидазные хромогены, и не является канцерогенным.

Если в исследуемом кале присутствуют специфические патогены, конъюгаты остаются связанными с соответствующими микрочайками, а фермент катализирует превращение бесцветного хромогена в пигментированное соединение. Интенсивность полученного синего цвета пропорциональна титру конкретных патогенов в образце. Ферментную реакцию останавливают подкислением, а оптическую плотность измеряют на фотометре при длине волны 450 нм. Значения оптической плотности микролунок с отрицательным контролем вычитаются из значений оптической плотности соответствующих положительных микролунок.

Положительный контроль поставляется в комплекте для подтверждения результатов теста.

## 3. СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшеты:** 96-луночные микропланшеты. Ряды А, С, Е, G сенсibilизированы специфическими антителами, ряды В, D, F, H сенсibilизированы не специфическими антителами.
  - Ряд А            анти-Ротавирус
  - Ряд В            контроль
  - Ряд С            анти-Коронавирус
  - Ряд D            контроль
  - Ряд Е            анти-*E. Coli* F5
  - Ряд F            контроль
  - Ряд G            анти-*Cryptosporidium*
  - Ряд H            контроль
- **Промывочный раствор:** 1 флакон концентрированного промывочного буфера. Раствор самопроизвольно кристаллизуется при охлаждении. Если необходимо использовать только часть раствора, доведите флакон до температуры 21°C +/-3°C до исчезновения всех кристаллов. Хорошо перемешайте раствор и отберите необходимый объем. Разбавьте буфер в соотношении 1:20 дистиллированной или деминерализованной водой.
- **Буфер для разбавления:** Один флакон концентрированного окрашенного буфера для

разведения образцов. Разбавьте концентрат дистиллированной или деминерализованной водой в соотношении 1:5. Если на дне емкости образуется осадок, отфильтруйте раствор на фильтровальной бумаге Whatman.

- **Конъюгат:** 4 виалы цветного конъюгата. Раствор готов к использованию.
  - Ротавирус (красный)
  - Коронавирус (желтый)
  - *E. Coli* F5 (голубой)
  - *Cryptosporidium* (зеленый)
- **Положительный контроль:** реагент готов к использованию
- **Однокомпонентный ТМБ:** один флакон хромогена тетраметилбензидина (ТМБ). Хранить при температуре 2 – 8°C в защищенном от света месте. Раствор готов к использованию.
- **Стоп-раствор:** Один флакон стоп-раствора 1 М фосфорной кислоты.

	<b>БИО-К 348/2</b>	<b>БИО К 348/5</b>
<b>Микропланшеты</b>	2	5
<b>Моющий раствор</b>	1 × 100 мл (20 X)	1 × 250 мл (20 X)
<b>Буфер для разбавления (подкрашенный)</b>	1 × 50 мл (5 X)	1 × 125 мл (5 X)
<b>Конъюгат</b>	4 × 6 мл (1 X)	4 × 15 мл (1 X)
<b>Положительный контроль</b>	1 × 4 мл (1 X)	1 × 10 мл (1 X)
<b>Однокомпонентный ТМБ</b>	1 × 25 мл (1 X)	1 × 55 мл (1 X)
<b>Стоп-раствор</b>	1 × 15 мл (1 X)	1 × 30 мл (1 X)

#### 4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, мензурки, пластиковые пробирки, штатив для пробирок, наконечники для дозаторов, емкость для реагентов для многоканальных пипеток, крышка, адгезивный уплотнитель для микропланшетов, градуированные автоматические (моно- и многоканальные) пипетки, ридер, а также промыватель и встряхиватель микропланшетов (опционально).

#### 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный тест следует использовать только для анализа *in vitro*, исключительно в области ветеринарии.
- Реагенты необходимо хранить при температуре 2 – 8°C. Гарантия не распространяется на реагенты с истекшим сроком годности или хранившиеся с нарушением условий.
- Концентрированный промывочный раствор и буфер для разведения можно хранить при комнатной температуре. После разбавления эти растворы стабильны в течение шести недель, если хранятся при температуре 2 – 8°C.
- Неиспользованные стрипы необходимо сразу же помещать в алюминиевую упаковку, следя за тем, чтобы влагопоглотитель оставался сухим, а упаковка – герметичной. Если эти меры безопасности соблюдены, пригодность стрипов сохранится вплоть до истечения срока годности набора.
- Не используйте реагенты из других наборов.
- Качество воды, используемой для приготовления различных растворов, является одним из самых важных условий. Не используйте воду, в которой могут содержаться окислители (например, гипохлорит натрия) или соли тяжелых металлов, поскольку эти вещества способны вступать в реакции с хромогеном.

- Не используйте растворы, контаминированные бактериями или грибами.
- Стоп-раствор содержит 1 М ортофосфорную кислоту. Обращайтесь с ним осторожно.
- Все материалы и одноразовое оборудование, которое контактирует с образцами, необходимо рассматривать как потенциально инфицированное и утилизировать в соответствии с действующим законодательством.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора. С особой тщательностью нужно следить за временем инкубации и температурой, а также точно измерять объемы и рассчитывать разбавления.

## 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием доведите все реагенты до температуры 21°C +/- 3°C.
2. Разбавьте концентрированный промывочный раствор в 20 раз дистиллированной водой (1 часть раствора : 19 частей воды). Убедитесь, что перед разбавлением все кристаллы исчезли.  
Разбавьте концентрированный буфер для разведения в 5 раз дистиллированной водой (1 часть буфера : 5 частей воды).
3. Разбавьте пробы кала буфером для разведения, приготовленном согласно пункту 2. Это только качественное разведение, которое должно позволять пипетировать каловые суспензии. Удалите все осадки путем естественной декантации в течение 10 минут. Не центрифугируйте суспензии.
4. Добавьте аликвоты разбавленных образцов по 100 мкл в лунки следующим образом: образец 1 в лунки стрипа 2, образец 2 в лунки стрипа 3 и т.д. Не забудьте про положительный контроль: 8 лунок стрипа 1 (100 мкл/лунку).
5. Накройте крышкой и инкубируйте планшет при температуре 21°C±3°C в течение одного часа.
6. Промойте планшет промывочным раствором, приготовленным в соответствии с инструкциями, приведенными в разделе Состав набора. Для этого удалите содержимое микропланшета, резко перевернув его над контейнером, наполненным инактивирующим агентом. Дайте содержимому микропланшета стечь, перевернув его вверх дном, на лист чистой абсорбирующей бумаги, чтобы удалить всю жидкость. Добавьте 300 мкл промывочного раствора, а затем снова опорожните планшет, перевернув его над емкостью с инактивирующим агентом. Повторите всю операцию еще два раза, стараясь избежать образования пузырьков в микролунках. После того как планшет будет промыт три раза, переходите к следующему шагу.
7. Добавьте по 100 мкл растворов конъюгатов в каждую лунку:
  - анти-ротавирус (красный) в ряды А, В
  - анти-коронавирус (желтый) в ряды С, D
  - анти-Е. coli F5 (синий) в ряды Е, F
  - анти-Cryptosporidium (зеленый) в ряды G, H
 Накройте крышкой и инкубируйте планшет при температуре 21°C ± 3°C в течение одного часа.
8. Промойте планшет, как описано в пункте 6 выше.
9. Добавьте 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 загрязнен. Инкубируйте при температуре 21°C

±3°C вдали от света в течение 10 минут. Не накрывайте. Этот интервал времени указан только в качестве ориентира, так как в некоторых случаях может быть полезно увеличить или сократить время инкубации.

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

11. Измерьте оптическую плотность с помощью микропланшетного спектрофотометра с фильтром 450 нм. Результаты должны быть считаны как можно быстрее после внесения стоп-раствора, так как в случае высокого значения хромоген может кристаллизоваться и привести к неправильным измерениям.

## 7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте чистую оптическую плотность для каждого образца путем вычитания из показаний для каждой лунки образца оптической плотности соответствующей отрицательной лунки.

Аналогично рассчитайте для антигена положительного контроля.

Тест действителен только в том случае, если антиген положительного контроля дает разницу в оптической плотности на 10 минуте, превышающую значения, указанные на листе данных QC.

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

$$\text{Value} = \frac{\Delta OD \text{ Образца} \times 100}{\Delta OD \text{ положительный}}$$

## 8. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

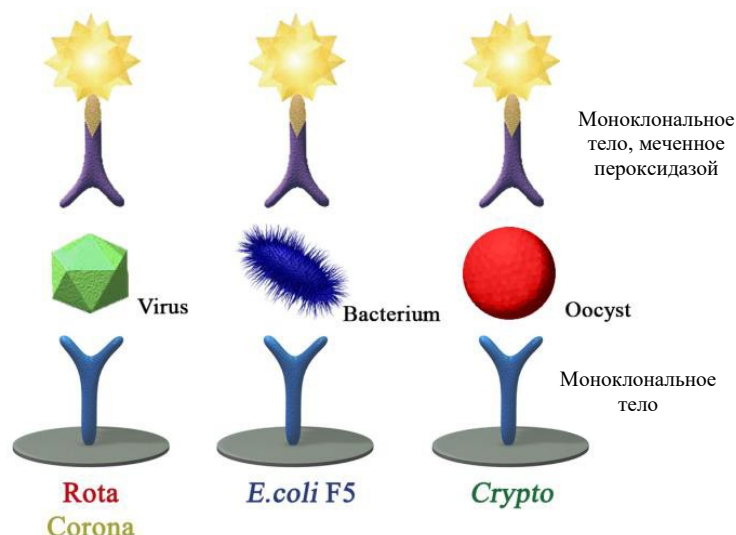
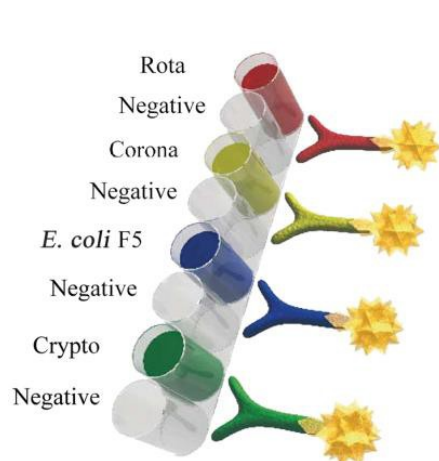
Multiscreen AgELISA Calf digestive:

2 × 12 тестов

BIO K 348/2

5 × 12 тестов

BIO K 348/5



***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

