Аденовирус 3 КРС

Набор для ИФА для серодиагностики аденовируса 3 крупного рогатого скота
Непрямой ИФА для анализа молока, сыворотки и плазмы крови
Диагностический тест для крупного рогатого скота
Двойные лунки

1. СОСТАВ НАБОРА

- Микротитровальные планшеты: два 96-луночных микротитровальных планшета (12 стрипов по 16 лунок). Нечетные столбцы (1, 3, 5, 7, 9 и 11) сенсибилизированы антигеном аденовируса 3; четные столбцы (2, 4, 6, 8, 10 и 12) – клеточным лизатом.
- **Промывочный раствор**: один 100мл флакон 20х концентрированного промывочного раствора. При охлаждении раствор кристаллизуется. Если нужно использовать только часть раствора, поместите флакон в условия с температурой 21 °C +/- 3 °C, пока не растворятся все кристаллы. Хорошо встряхните раствор и отберите необходимый объем. Разведите буфер дистиллированной или деионизированной водой в отношении 1:20.
- **Буфер для разведения:** один 50-мл флакон 5х концентрированного подкрашенного буфера для разведения проб сыворотки, плазмы и конъюгата. Содержимое флакона разбавляют дистилированной или деионизированной водой в соотношении 1:5. Если на дне сосуда образуется осадок, профильтруйте раствор через фильтровальную бумагу.
- Конъюгат: Один флакон антибычьих иммуноглобулинов IgG1 моноклональных антител, конъюгированных пероксидазой хрена.
- Положительный контроль: один флакон положительной сыворотки. Хранение +2°C-+8°C.
- Отрицательный контроль: один флакон отрицательной сыворотки. Хранение +2°C-+8°C.
- Референсный образец: Один флакон. Содержимое флакона разбавляют в 0,5 мл дистилированной или деионизированной воды. Восстановленный реагент хранится при -20 °C в четение нескольких месяцев. Этот референсный образец может быть использован для контроля внутрилабораторной воспроизводимости партии набора.
- Внутрилабораторная воспроизводимость: Сопоставление результатов, полученных в лаборатории при анализе одних и тех же проб в разное время, разными исполнителями и т.д.
- Однокомпонентный ТМБ: один флакон хромогена тетраметилбензидина (ТМБ). Условия хранения +2°C-+8°C в защищенном от света месте. Раствор готов к использованию.
- Стоп-раствор: один флакон 1М ортофосфорной кислоты в качестве стоп-раствора.

	BIO K 063/2
Микропланшеты	2
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20x)
Буфер для разведения (подкрашенный)	1 x 50 мл (5x)
Конъюгат	1 x 0,5 мл (50x)
Положительная сыворотка	1 x 0,5 мл (1x)
Отрицательная сыворотка	1 x 0,5 мл (1x)
Референсный образец	1 x 0,5 мл (1x)
Однокомпонентный ТМБ	1 x 25 мл (1x)
Стоп-раствор	1 x 15 мл (1x)

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ТРЕБУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, лабораторные стаканы, пластиковые пробирки, пробирочный штатив, наконечники для дозаторов, резервуар для многоканальных пипеток, крышка, клей для микропланшетов, градуировочные автоматические (одно- и многоканальные) пипетки, микропланшетный ИФА фотометр, а также микропланшетный промыватель и шейкер (необязательно).

3. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

- Данный тест следует использовать только для анализа in vitro, исключительно в области ветеринарии.
- Реагенты необходимо хранить при температуре от +2°C до +8°C. Гарантия не распространяется на реагенты в случае, если у них истек срок годности или если условия их хранения отличались от описанных в этом вкладыше.
- Концентрированный промывочный раствор и буфер для разведения можно хранить при комнатной температуре. После разведения эти растворы стабильны в течение шести недель, если хранятся при температуре от 2°C до +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, активность 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 пунктов. 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, загрязненные 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 инфекционное и утилизировать в соответствии с действующим законодательством страны.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора. С особой тщательностью нужно следить за временем и кубации и температурой, а также точно измерять объемы и рассчитывать разбавления.

4. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

1. Перед использованием поместить все компоненты в среду с температурой 21°C+/- 3°C. Достать микротитровальный планшет из упаковки.
2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ
2.1 Сыворотка и плазма крови должны быть разбавлены в соотношении 1:100. Избегайте использование гемолизированных образцов или образцов, содержащих сгустки.
2.1.1 Разведение в пробирках
Внесите по 990 мкл аликвоты буфера для разведения, приготовленного согласно пункта «СОСТАВ НАБОРА» данной инструкции в 5 или 10 мл пробирки. Внесите по 10 мкл аликвоты проб в каждую пробирку и недолго мешайте (возможно использование механической мешалки (окончательное разведение 1:100).
2.1.2 Разведение в микропланшете
Внесите по 20мкл аликвоты каждой пробы в лунки микропланшета для разведения. Добавьте 180 мкл буфера для разведения. Перемешайте 5 раз набором и сливом жидкости из пипет-дозатора (разведение 1:10). Внесите по 90 мкл аликвоты буфера для разведения в лунки микротитровального планшета. Внесите 10 мкл предварительно разведенных проб (1:10). Перемешайте 5 раз набором и сливом жидкости из пипет-дозатора (окончательное разведение 1:100).
2.2 Разведение контрольных сывороток (положительный и отрицательный контроли) и референсного образца
Положительный и отрицательный контроли сыворотки и референсный образец должны быть разведены в соотношении 1:100 (смотрите пункт 2.1.1 или 2.1.2).

2.3 Подготовка молока
Центрифугируйте при 4000g в течение 20 минут. Возьмите средний слой с помощью стеклянной пипетки Пастера, вставленной через верхний слой сливок. Следите за тем, чтобы не было контакта с осадком. Используйте пробы неразбавленного обезжиренного молока.
2.3.1 Разведение в пробирках
Распределите по 750 мкл аликвоты буфера для разведения, подготовленного согласно пункта «СОСТАВ НАБОРА» данной инструкции в 5 или 10 мл пробирки. Добавьте 250 мкл аликвоты молока в каждую из этих пробирок и недолго мешайте (можно использовать механическую мешалку) (окончательное разведение 1:4).
2.3.2 Разведение в микропланшете
Распределите по 60 мкл каждой пробы в лунки микропланшета для разведения. Добавьте 180 млк буфера для разведения. Перемешайте 5 раз дозатором путем повторного всасывания. (разведение 1:4). Внесите 100млк аликвоты разведенных проб микропланшет набора.
3. Внесите пробы по 100 мкл в каждую лунку. Например можете следовать по следующей схеме: положительная сыворотка в лунки A1 и A2, отрицательная сыворотка в лунки B1 и B2, референсный образец в лунки C1 и C2, проба1 в лунку D1 и D2 и так далее. Накройте планшет и инкубируйте при температуре 21°± 3°C в течение 1 часа.
4. Промойте планшет моющим раствором, подготовленным согласно пункта «СОСТАВ НАБОРА» данной инструкции. Для этого, вылейте содержимое из лунок планшета путем резкого переворачивания. Дополнительно необходимо перевернутый планшет постучать по столу, накрытому фильтровальной бумагой, для лучшего удаления остатков жидкости. Добавьте 300 мкл промывочного раствора, а затем вылейле содержимое из лунок еще раз, резко переворачивая его над емкостью. Повторите процедуру еще два раза, избегая образования пузырьков в лунках. После 3х-кратной промывки планшета перейдите к следующему шагу.
5. Разведите конъюгат в соотношении 1:50 буфером для разведения (например, для одного планшета разведите 250 мкл исходного раствора конъюгата в 12,250 мл разбавителя). Добавьте 100 мкл разведенного конъюгата в каждую лунку.
Накройте планшет и инкубируйте при температуре 21 °C ± 3 °C в течение 1 часа.
6. Промойте планшет как описано в пункте 4.
7. Добавьте 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку планшета. Хромоген должен быть абсолютно бесцветным при добавлении в лунки. Голубая окраска хромогена говорит о контаминации.
8. Инкубируйте планшет в течение 10 минут при температуре 21 °C ± 3 °C в темноте и в закрытом виде. Это время используется в качестве ориентира, так как в некоторых случаях было бы уместно уменьшить или увеличить время инкубации.
9. Добавьте 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Голубая окраска лунки сменится на желтый цвет.
10. Измерьте оптическую плотность в лунках, используя микропланшетный фотометр с длиной волны 450 нм. Результаты должны быть прочитаны сразу после внесения стоп-раствора, так как хромоген в лунках может кристаллизоваться, сильно искажая результаты.

5. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычтите из значение оптической плотности для каждого значения, полученного для нечетных стрипов и соответствующего отрицательного контроля и запишите результат. При выполнении этого расчета допускается наличие любых отрицательных значений. Выполните те же действия и для столбца, соответствующего положительному контролю. Тест может быть подтвержден только в случае, если положительный контроль сыворотки имеет оптическую плотность больше, чем 0,600, а отрицательный контроль ниже, чем 0,200.

Разделите оптическую плотность для каждого образца на соответствующее значение оптической плотности положительного контроля и умножьте этот результат на 100, чтобы получить результат в процентах:

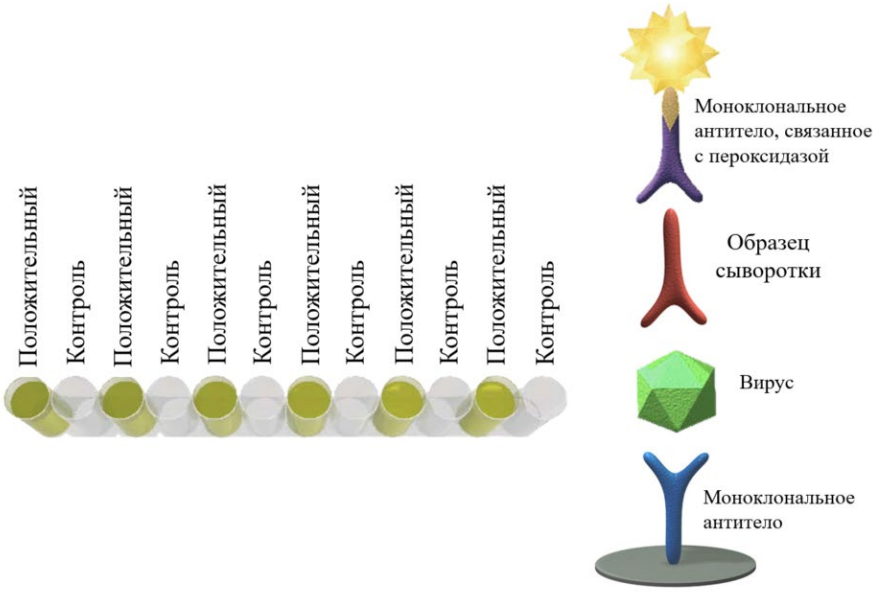
$$\text{Значение} = \frac{\Delta\ \text{ОП пробы} * 100}{\Delta\ \text{ОП положит}}$$

Используя следующие данные, интерпретируют результаты:

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	10 %	< Val <=	33 %	< Val <=	56 %	< Val <=	79 %	< Val <=	102 %	< Val

Надёжный результат может быть поставлен в том случае, если уровень сероконверсии может быть документально оформлен с использованием двух образцов сыворотки, с 2-3 недельными интервалами. Первый образец должен быть взят во время острой фазы инфекции. Считается, что сероконверсия произошла, если сигнал увеличивается на два порядка (два плюса, например, ++ -> ++++ или + -> +++). Образец следует считать положительным, если получен результат в 1 или более плюсов.

6. СХЕМА АНАЛИЗА



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 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