

MONOSCREEN[®] Ab ELISA

Набор для проведения иммуноферментного определения *Clostridium perfringens* α токсин БИО К 291 МОНОСКРИН

Версия инструкции 2.1

Конкурентный ИФА в сыворотке и плазме крови
Диагностический тест для всех видов

1. ВВЕДЕНИЕ

Энтеротоксемия – это смертельное кишечное заболевание, поражающее все виды домашних животных и вызываемое токсигенным типом *Clostridium perfringens*. Последний представляет собой анаэробную грамположительную бактерию, которая обладает способностью образовывать термостойкие эндоспоры. Эта бактерия подразделяется на пять типов (типы А, В, С, D и Е) в соответствии с четырьмя основными производимыми летальными токсинами: альфа, бета, эпсилон и йота. Было показано, что *C. perfringens* является причиной таких заболеваний человека, как газовая гангрена (клостридиальный мионекроз), пищевое отравление, некротизирующий энтероколит у младенцев и некротический энтерит (pigbel). *C. perfringens* также является возбудителем дизентерии ягнят, энтеротоксемии овец и болезни почек овец, а также других энтеротоксемических заболеваний ягнят и телят. Большое количество токсина в дополнение к большому количеству клеток *C. perfringens* обычно можно обнаружить в кишечной жидкости больных или мертвых животных. Поскольку *C. perfringens* является естественным комменсалом кишечника человека и животных, идентификации бактерии недостаточно. Токсинотипирование и количественная оценка выделенных штаммов имеют важное значение. Тест БИО К 291 разработан для мониторинга серологического ответа животного после иммунизации вакциной или естественного контакта с *Clostridium perfringens*. Поскольку это тест на блокировку, его можно использовать для всех видов животных.

2. ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА

96-луночный микропланшет сенсibilизирован рекомбинантным альфа-токсином *C. perfringens*. Оператор вносит ранее разбавленные тестовые сыворотки и плазму в лунки микропланшета. После 2-часовой инкубации и отмывки оператор добавляет конъюгат, который представляет собой специфическое моноклональное антитело против *Clostridium perfringens* альфа-токсин, связанный с пероксидазой. После инкубации и промывки препарата оператор добавляет тетраметилбензидин (ТМБ). Интенсивность цвета обратно пропорциональна титру сыворотки пробы. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки поставляются вместе с набором, чтобы можно было проверить.

3. СОСТАВ НАБОРА

- Микропланшеты: 96-луночные планшеты для микротитрования. Лунки микропланшета сенсibilизирована альфа-токсином *C. perfringens*.
- Моющий раствор: одна бутылка 20-кратного концентрированного моющего раствора. При охлаждении раствор самопроизвольно кристаллизуется. Если нужно использовать только часть раствора, доведите емкость до 21 ° С +/- 3 ° С до исчезновения всех кристаллов. Хорошо перемешайте раствор. Разбавьте буфер 1:20 дистиллированной или деминерализованной водой. Хранить разбавленный раствор при температуре от + 2 ° С до + 8 ° С.
- Буфер для разведения: один флакон окрашенного буфера для разведения образцов и конъюгата. Буфер для разведения готов к использованию. Хранить раствор при температуре от

+ 2 ° С до + 8 ° С. Если на дне емкости образовался осадок, отфильтруйте раствор на фильтровальной бумаге Whatman.

- Конъюгат: 1 флакон конъюгата анти-альфа-токсин-пероксидаза против *S. perfringens* (меченное пероксидазой хрена моноклональное антитело против альфа-токсина *S. perfringens*). Реагент необходимо развести 1:20 буфером для разведения.

- Положительный контроль: один флакон с положительной сывороткой. Храните этот реагент при температуре от + 2 ° С до + 8 ° С.

- Отрицательная ссылка: один флакон с отрицательной сывороткой. Храните этот реагент при температуре от + 2 ° С до + 8 ° С.

- Однокомпонентный ТМБ: один флакон хромогенного тетраметилбензидина (ТМБ). Хранить при + 2 ° С и + 8 ° С в защищенном от света месте. Этот раствор готов к использованию.

- Стоп-раствор: одна бутылка стоп-раствора 1 М фосфорной кислоты.

	БИО К 291/1	БИО К 291/2
Микропланшеты	1	2
Промывочный раствор	1 x 100 мл (20x)	1x100 мл (20x)
Буфер для разведения (подкрашенный)	1 x 60 мл (1x)	1x60 мл (1x)
Конъюгат	1 x 0,625 мл (20x)	1 x 1,25 мл (20x)
Положительная сыворотка	1 x 0,5 мл (1x)	1 x 0,5 мл (1x)
Отрицательная сыворотка	1 x 0,5 мл (1x)	1 x 0,5 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)

4. 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 ридер, а также микропланшетный промыватель и шейкер (необязательно).

5. 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 инкубации и температурой, а также точно измерять объемы и рассчитывать разбавления.

6. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

1. Перед использованием поместить все компоненты в среду с температурой 21°C +/- 3°C. Вынуть микропланшет из упаковки.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотка и плазма крови должны быть разбавлены в 2 раза. Избегайте использование гемолизированных образцов или образцов, содержащих сгустки.

Внесите 50 мкл буфера для разведения непосредственно в лунки микропланшета. Добавьте 50 мкл аликвоты каждого образца в каждую лунку. Сделайте то же самое для контрольных сывороток (положительной и отрицательной). Накройте крышкой планшет и инкубируйте при $\pm 37^{\circ}\text{C}$ в течение 2-х часов.

3. Промойте планшет промывочным раствором, приготовленного, как указано в разделе «СОСТАВ НАБОРА». Для этого, опустошите лунки планшета путем резкого переворачивания. Дополнительно необходимо перевернутый планшет постучать по столу для лучшего удаления остатков жидкости. Добавьте 300 мкл промывочного раствора, а затем опустошите микропланшет 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.

4. Разведите конъюгат 1:20 буфером для разведения (например, для одного планшета разбавьте 600 мкл конъюгата исходного раствора в 11.400 мл буфера для разведения).

Добавьте в каждую лунку, приготовленных 100 мкл конъюгата. Накройте крышкой и инкубируйте при 37°C в течение 30 минут.

5. Промойте микропланшет моющим раствором как описано в пункте 3.

6. Добавьте 100 мкл раствора хромогена в каждую лунку планшета. Раствор хромогена должен быть совершенно бесцветным при внесении в лунки. Если хромоген окрашен в синий цвет, то это означает, что раствор в пипетке был загрязнен.

7. Инкубируйте в течение 10 минут при температуре $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, в защищенном от света месте не накрывая. Это время используйте в качестве ориентира, так как в некоторых случаях время инкубации следует увеличивать или уменьшать.

8. Внесите 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку планшета. Голубая окраска должна смениться на желтую.

9. Измерьте оптическую плотность в лунках используя планшетный ридер с длиной волны 450 нм. Результаты должны быть прочитаны сразу после внесения стоп-раствора, так как хромоген в лунках может кристаллизоваться, сильно искажая результаты.

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерьте оптическую плотность положительных и отрицательных сывороток (ОПполож и ОПотриц), всех образцов (ОПпроб). Рассчитайте процент ингибирования (% ингибирования) для каждого испытуемого образца и положительной сыворотки с помощью следующих формул:

$$\% \text{ингиб проб} = [(ОПотриц - ОПпроб)/ОПотриц] * 100$$

$$\% \text{ингиб полож} = [(ОПотриц - ОПполож)/ОПотриц] * 100$$

8. ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА

Тест должен быть валидирован только если выполняются следующие 2 условия:

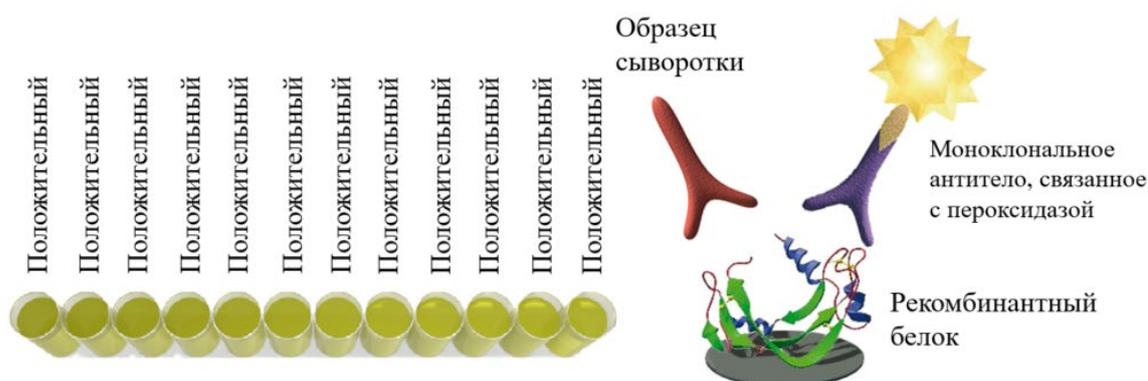
- ОПотриц - ОПполож > 0.7

- % ингиб полож > 30%

9. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определите степень позитивности каждого образца по шкале приведенной в таблице 1.

Определенное значение	Степень позитивности
% ингибирования < 20	0
20 <= % ингибирования < 40	+
40 <= % ингибирования < 60	++
60 <= % ингибирования < 80	+++
80 <= % ингибирования	++++



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

