

# MONOSCREEN<sup>®</sup> Ab ELISA

## *Clostridium perfringens* бета токсин

Набор ИФА для антигенного выявления бета-токсина *Clostridium perfringens*  
Сэндвич-тест для культуральных супернатантов и биологических жидкостей  
Диагностический тест для всех видов  
Двойные лунки

### **I – ВВЕДЕНИЕ**

ВоHV-4 (бычий герпесвирус-4) считается вероятным возбудителем крупного рогатого скота. Этот вирус был выделен от животных с различными клиническими признаками. Нередко оно связано с патологиями, затрагивающими половые пути (орхитом или метритом). Он также был выделен от крупного рогатого скота, страдающего расстройствами глаз, дыхания или пищеварения или даже поражениями кожи. Его присутствие было также продемонстрировано у животных, внешне здоровых.

Диагностировать инфекцию, вызванную ВоHV-4, можно путем выделения вируса на чувствительной клеточной линии. Рост вируса в этой клеточной линии можно продемонстрировать с помощью специфического антитела, связанного с флуорохромом. Энтеротоксемия — смертельное кишечное заболевание, поражающее все виды домашних животных и вызываемое токсигенным типом *Clostridium perfringens*. Последняя представляет собой анаэробную, сильно грамположительную бактерию, обладающую способностью образовывать термостойкие эндоспоры. Эта бактерия сгруппирована в пять типов (типы А, В, С, D и E) в соответствии с четырьмя основными летальными токсинами: Альфа, Бета, Эпсилон и Йота.

Было показано, что *Clostridium perfringens* является причиной таких заболеваний человека, как газовая гангрена (кlostридиальный мионекроз), пищевое отравление, некротизирующий энтероколит младенцев и некротический энтерит (свиной энтерит). Он также является возбудителем дизентерии ягнят, энтеротоксемии (пораженной) овец и мясистых почек овец, а также других энтеротоксемических заболеваний ягнят и телят. В кишечной жидкости больных или мертвых животных обычно можно обнаружить большое количество токсина в дополнение к большому количеству клеток *Clostridium perfringens*.

Поскольку *Clostridium perfringens* является естественным комменсалом кишечника человека и животных, идентификации бактерии недостаточно. Токсинотипирование и количественная оценка выделенных штаммов имеют важное значение.

Набор работает как с культуральными супернатантами, так и с биологическими зондами, такими как жидкое содержимое кишечника и перикардиальная или перитонеальная жидкость.

### **II – ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА**

В тесте используются 96-луночные микротитровальные планшеты, сенсibilизированные специфическими моноклональными антителами к бета-токсину. Эти антитела позволяют специфически захватывать соответствующий антиген, присутствующий в образцах. Ряды А, С, Е, G были сенсibilизированы этими антителами, а ряды В, D, F, H содержат неспецифические антитела. Эти контрольные ряды позволяют различать специфическую иммунологическую реакцию и неспецифическое связывание.

Биологические образцы (например: содержимое тонкого кишечника, перитонеальная жидкость...) разводятся в буфере для разведения и инкубируются на микропланшете в течение 1 часа при температуре 21°C +/- 3°C. Культуральные супернатанты используют без разбавления.

После этого первого этапа инкубации планшет промывают и инкубируют в течение 1 часа с конъюгатом - меченым пероксидазой специфичным моноклональным антителом против бета-токсина. После второй инкубации планшет снова промывают и добавляют хромоген (тетраметилбензидин). Преимущество этого хромогена состоит в том, что он более чувствителен, чем другие хромогены пероксидазы, и не является канцерогенным.

Если в тестируемых образцах присутствует бета-токсин, конъюгат остается связанным с соответствующими микролунками, а фермент катализирует превращение бесцветного хромогена в пигментированное соединение. Интенсивность полученного синего цвета пропорциональна титру бета-токсина в образце. Ферментативную реакцию можно остановить подкислением, а полученную оптическую плотность при 450 нм можно зарегистрировать с помощью фотометра. Сигналы, записанные для микролунок отрицательного контроля, вычитаются из соответствующих микролунок положительного контроля.

В комплект поставки входит положительный антиген.

### ТИПЫ ТОКСИНОВ

Тип токсина	Альфа	Бета	Эпсилон	Йота
А	++	-	-	-
В	+	++	+	-
С	+	++	-	-
Д	+	-	++	-
Е	+	-	-	++

### III – СОСТАВ НАБОРА

- **Микропланшеты:** 96-луночный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок). Ряды А, С, Е, G сенсibilизированы специфическими антителами к бета-токсину, тогда как ряды В, D, F, H сенсibilизированы неспецифическими антителами.

- **Промывочный раствор:** концентрированный моющий раствор для бутылок. Раствор самопроизвольно кристаллизуется в холодном состоянии. Если необходимо использовать только часть раствора, доведите температуру флакона до 21°C +/- 3°C до исчезновения всех кристаллов. Хорошо перемешайте раствор и удалите необходимый объем. Разбавьте буфер 1:20 дистиллированной или деминерализованной водой.

- **Буфер для разведения:** один флакон пятикратного цветного концентрированного буфера для разведения образцов. Разбавьте этот концентрированный буфер для разведения 1:5 дистиллированной или деминерализованной водой. Если на дне емкости образуется осадок, отфильтруйте раствор на фильтровальной бумаге Whatman.

- **Конъюгат:** флакон с окрашенным конъюгатом анти-бета-токсин-пероксидаза. Это решение готово к использованию.

- **Контрольный антиген:** этот реагент готов к использованию.

Однокомпонентный ТМБ: флакон с хромогеном тетраметилбензидином (ТМБ). Хранить при температуре +2°C и +8°C в защищенном от света месте. Это решение готово к использованию.

- **Стоп-раствор:** флакон с 1 М стоп-раствором фосфорной кислоты.

	БИО К 267/1	БИО К 267/2
Микропланшеты	1	2
Промывочный раствор	1 X 100 мл (20X)	1 X 250 мл (20X)
Буфер для разведения	1 X 50 мл (5X)	1 X 50 мл (5X)
Конъюгат	1 X 12 мл (1 X)	1 X 25 мл (1 X)
Контрольный антиген	1 X 2 мл (1 X)	1 X 4 мл (1 X)
Однокомпонентный ТМБ	1 X 12 мл (1 X)	1 X 25 мл (1 X)
Стоп-раствор	1 X 6 мл (1 X)	1 X 15 мл (1 X)

### IV – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дистиллированная вода, градуированные цилиндры, химические стаканы, пластиковые пробирки, штатив для пробирок, наконечники-дозаторы, резервуар для реагентов для многоканальных пипеток, крышка, клей для микропланшетов, градуированные автоматические (моно- и многоканальные) пипетки, устройство для считывания микропланшетов, промыватель и шейкер для микропланшетов (необязательно).

### V – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Этот тест можно использовать только для диагностики «in vitro». Это строго для ветеринарного использования.

- Реагенты должны храниться при температуре от +2°C до +8°C. Гарантия на реагенты не предоставляется, если срок годности истек или если они не хранились в условиях, описанных в данном вкладыше.

- Концентрированный промывочный раствор и буфер для разведения можно хранить при комнатной температуре. После разведения эти растворы остаются стабильными в течение шести недель при хранении при температуре от +2°C до +8°C.

- Неиспользованные полоски следует немедленно хранить в алюминиевом конверте, следя за тем, чтобы влагопоглотитель оставался сухим, а конверт герметично закрывался. Если принять эти меры предосторожности, активность полосок можно сохранить до истечения 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, поскольку эти вещества могут вступать в реакцию с хромогеном.

- Выбросьте все растворы, загрязненные бактериями или грибами.

- Стоп-раствор содержит 1 М фосфорной кислоты. Обращайтесь с ним осторожно.

- Все материалы и одноразовое оборудование, контактирующие с образцами, должны считаться потенциально инфекционными и подлежат утилизации в соответствии с действующим законодательством страны.

- Чтобы гарантировать достоверность результатов, необходимо строго следовать протоколу. Особое внимание необходимо уделять соблюдению времени и температуры инкубации, а также точному измерению объемов и разбавлений.

## ***VI – ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА***

1- Перед использованием доведите все реагенты до температуры 21°C +/- 3°C.

2- Разбавьте концентрированный промывной раствор в 20 раз дистиллированной водой. Перед разбавлением убедитесь, что все кристаллы исчезли.

Разбавьте концентрированный буфер для разведения в 5 раз дистиллированной водой.

Храните эти растворы при температуре + 2°C и + 8°C, когда они не используются.

3- Разбавьте образцы по объему в буфере для разбавления, приготовленном в соответствии с инструкциями в §2. Это только качественное разведение, которое должно позволять дозировать биологические суспензии. Выбросьте остатки жидкости путем естественной декантации в течение примерно 10 минут. Не центрифугируйте суспензии. Культуральные супернатанты используют неразбавленными. Наилучшие результаты были получены при использовании жидкого ТГИ в анаэробных условиях (в пробирке без встряхивания) при 37°C. Образцы можно культивировать в течение 8 часов или в течение ночи.

Состав TGY:

Триптиказа (казеин-триптический пептон):	30 г
Дрожжевой экстракт	20 г
Глюкоза	1 г
L-цистин	1 г

Растворите триптиказу и дрожжевой экстракт в 950 мл воды и автоклавируйте. Растворяют глюкозу и L-цистеин в 50 мл воды и стерилизуют фильтрованием. Смешайте два раствора, когда температура первого из них составит 21°C +/- 3°C.

4- Добавьте аликвоты разбавленных образцов или неразбавленных супернатантов по 100 мкл в лунки следующим образом: образец 1 в лунки A1 и B1, образец 2 в лунки C1 и D1 и т. д. Действуйте таким же образом для положительного эталона (пример: G1 и H1)

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

6- Промойте планшет моющим раствором, приготовленным согласно инструкциям в разделе «Состав набора». Для этого утилизируйте содержимое микропланшета, резко перевернув его над контейнером, наполненным инактивирующим агентом. Оставьте микропланшет стечь вверх дном на листе чистой впитывающей бумаги, чтобы удалить всю жидкость. Добавьте 300 мкл промывного раствора, а затем еще раз опорожните планшет, перевернув его над защитным сосудом. Повторите всю операцию еще два раза, стараясь избежать образования пузырьков в микролунках. После того, как планшет промыт три раза, приступайте к следующему этапу.

7- Распределите раствор конъюгата из расчета 100 мкл на лунку. Накройте крышкой и инкубируйте планшет при температуре 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 при внесении в лунки пипеткой должен быть абсолютно бесцветным. Если виден синий цвет, это означает, что раствор в пипетке загрязнен.

Инкубируйте при температуре 21°C +/- 3°C и в защищенном от света месте в течение 10 минут. Не накрывай. Этот временной интервал дан только в качестве ориентира, поскольку в некоторых обстоятельствах может быть полезно продлить или сократить время инкубации.

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

11- Измерьте оптическую плотность с помощью микропланшетного спектрофотометра с фильтром 450 нм. Результаты необходимо считывать как можно быстрее после нанесения стоп-раствора, поскольку в случае сильного сигнала хромоген может кристаллизоваться и привести к неверным измерениям.

## VII – ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте чистую оптическую плотность каждого образца, вычитая из показаний для каждой лунки образца оптическую плотность соответствующего отрицательного контроля.

Действуйте таким же образом для антигена положительного контроля.

Тест считается валидированным только в том случае, если антиген положительного контроля дает разницу в оптической плотности через 10 минут, превышающую значение, указанное в листе данных контроля качества.

Разделите сигнал, считываемый для каждой лунки образца, на соответствующий сигнал положительного контроля и умножьте этот результат на 100, чтобы выразить его в процентах. Используя первую таблицу процедуры контроля качества, определите статус каждого образца (положительный, отрицательный).

$$\text{значение} = \frac{\text{Дельта ОП образца} \times 100}{\text{Дельта ОП полож. образца}}$$

## VIII – ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

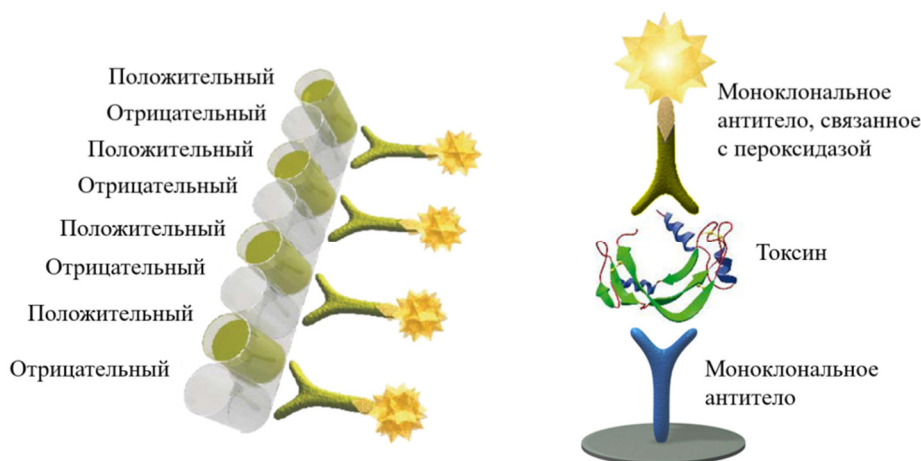
Monoscreen AgELISA Clostridium perfringens beta toxin

1 x 48 тестов

BIO K 267/1

2 x 48 тестов

BIO K 267/2



### 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. Раstopчина, 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

