

VetLine Parainfluenza (Вирус парагриппа)

ELISA

Ферментный иммуноанализ для качественного определения антител против вируса парагриппа в ветеринарной сыворотке млекопитающих

1. ВВЕДЕНИЕ

Вирусы парагриппа являются важными вирусными патогенами, вызывающими респираторные инфекции верхних и нижних дыхательных путей. Вирусы принадлежат к семейству Paramyxoviridae. Они представляют собой овальные одноцепочечные РНК-вирусы со сферической или плеоморфной формой. Вирусы парагриппа являются относительно большими вирусами диаметром около 150-300 нм. Параинфлюзавирус реплицируется в верхних дыхательных путях и вызывает легкие заболевания верхних дыхательных путей и ринит.

Вирус собачьего парагриппа (СРIV), связанный с вирусом собачьего герпеса (СНV), вирусом Canine Adeno типа 2 (CAV-2) и бактерией Bordetella bronchiseptica.

Собаки любого возраста, породы или пола могут быть заражены этим вирусом. Часто нет клинических признаков. Если появятся легкие верхние респираторные симптомы, это будет ринит, поэтому симптомы будут включать в себя носовые выделения, чихание и мягкий кашель.

Кашель из питомника (также известный как собачий инфекционный трахеобронхит) - инфекция верхних дыхательных путей, поражающая собак. В питомнике кашель могут быть связаны с различными вирусами и бактериями, вызывающими болезни. Чаще всего наблюдаются в этом случае вирус 2-го типа (СрIV-2) с собачьими парагриппами и бактерии Bordetella bronchiseptica. Кашель становится хуже, если в сочетании с Bordetella.

Бычья парагриппа - 3 - вирус семейства Paramyxoviridae, и его вирулентность зависит от изолятов. В одиночку этот вирус обычно не вызывает серьезных заболеваний у крупного рогатого скота, но с другими агентами, такими как Bovine Respiratory Syncytial Virus, Infectious Bovine Rhinotracheitis и такими бактериями, как Mannheimia и Mycoplasmas, входит в комплекс энзоотической пневмонии, который в основном поражает телят.

По-видимому, причиной возникновения заболевания является стресс, например, смешение животных разных возрастных групп, транспортировки и зимнего жилья. Плохое соблюдение гигиены также способствует этому.

Инфекции можно подтвердить двумя способами:

- путем выделения и идентификации вируса в клеточной культуре или путем прямого обнаружения вируса в респираторных выделениях (обычно, собранных в течение одной недели после появления симптомов) с использованием иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа или полимеразной цепной реакции и
- путем демонстрации значительного увеличения специфических IgG-антител между соответствующими собранными парными образцами сыворотки или специфическими IgM-антителами в одном образце сыворотки.

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ELISA NovaTec VetLine предназначен для качественного определения антител против вируса парагриппа в ветеринарной сыворотке млекопитающих.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Микротитровальные стрипованные лунки предварительно покрывают антигенами парагриппа для связывания соответствующих антител образца. После промывки лунок для удаления всех несвязанных образцов добавляют пероксидазу хрена (HRP), меченную протеином А / G. Этот конъюгат связывается с захваченными Aspergillus специфическими антителами. Иммуновый комплекс образованного конъюгата визуализируют путем добавления тетраметилбензидином (ТМБ). Раствор дает синий цвет реакции. Интенсивность цвета пропорционально количеству Aspergillus специфических антител в образце. Серная кислота добавляется чтобы остановить реакцию. Это дает конечный желтый цвет. Поглощение в 450 нм считывается при помощи ELISA ридер пластины.

4.1. Реагенты поставляются

VetLine парагрипп покрытые лунки: 12 рядный планшет с 8-ью хорошо отламывающимся полосками, покрытыми антигеном; закрытый алюминиевой фольгой.

Разбавитель образца **: 1 флакон, содержащий 100 мл буфера для разведения образцов; рН $7,2 \pm 0,2$; желтого цвета; готовый к использованию; белый колпак.

Стоп-раствор: 1 флакон, содержащий 15 мл серной кислоты, 0,2 моль / л; готовый для использования; Красный колпачок.

Промывочный раствор (20-ти кр конц.) *: 1 флакон, содержащий 50 мл 20-кратного концентрированного буфера (рН $7,2 \pm 0,2$) для промывки лунок; белый колпак.

VetLine Парагриппозный Белковый А / G Конъюгат **: 1 флакон, содержащий 20 мл пероксидазы белка А / G; окрашены в желтый цвет

ТМВ Раствор субстрата: 1 флакон, содержащий 15 мл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ); готов к использованию; желтый колпачок.

VetLine Парагриппозный Положительный контроль **: 1 флакон, содержащий 2 мл; желтого цвета; готовый к использованию ; Красный колпачок.

VetLine Парагриппозный Пороговый контроль **: 1 флакон, содержащий 3 мл; желтого цвета; готовый к использованию; зеленый колпачок.

VetLine Парагриппозный Отрицательный контроль **: 1 флакон, содержащий 2 мл; желтого цвета; готовый к использованию; синий колпачок.

* Содержит 0,1% Bronidox L после разбавления

** Содержит 0,1% Катон

4.2. Поставленные материалы

1 Стрип-держатель

1 крышка из фольги

1 Тест -протокол

1 план распределения и идентификации

4.3. Необходимые материалы и оборудование

ELISA Микропланшетный ридер, оснащенный оптической системой для измерения плотности при 450/620 нм

Инкубатор 37 ° С

Ручное или автоматическое оборудование для промывки скважин

Пипетки поставляться объемы от 10 до 1000 мкл

смеситель вихревой трубы

деионизованная или (свежая) дистиллированная вода

Одноразовые трубки

Таймер

5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке при хранении 2 ... 8 ° С.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно довести все реагенты, образцы и контроли до комнатной температуры (20 ... 25 ° С) перед началом анализа!

6.1. Стрипы покрытые антигеном парагриппа.

Хранить при температуре 2 ... 8 ° С. Сразу после удаления стрипов оставшиеся стрипы должны быть запечатаны в алюминию фольгу вместе с поглотителем влаги, и храниться при т 2 ... 8 ° С ;стабильны до истечения срока годности.

6.2. Вирус контактащего иммунодефицита конъюгат

Бутылка содержит 20 мл раствора с белком А / G, пероксидаза хрена, буфер, стабилизаторы, консерванты и инертный желтый краситель. Раствор готов к использованию. Хранить при температуре 2 ... 8 ° С.

После первого вскрытия годен до указанного срока годности при хранении при 2 ... 8 ° С.

6.3. Контроли

Бутыли, помеченные как Положительный, Пороговый и Отрицательный Контроль содержат 2 соотв. 3 мл готового к использованию контрольного раствора. Он содержит 0,1% Катона и должен храниться при температуре 2 ... 8 ° С. После первого вскрытия годен до истечения срока годности при хранении 2 ..8°C.

6.4. Разбавитель образца

Флакон содержит 100 мл фосфатного буфера, стабилизаторы, консерванты и инертный желтый краситель. Он используется для разбавления образцов. Этот готовый к использованию раствор должен храниться при температуре 2 ... 8 ° С. После первого вскрытия годен до указанного срока годности при хранении при 2 ... 8 ° С.

6.5. Промывочный раствор (20хconc.)

Бутыль содержит 50 мл концентрированного буфера, моющих средств и консервантов. Развести промывочный раствор 1 + 19; например 10 мл промывочного раствора + 190 мл свежей или редистиллированной водой. Разбавленный буфер будет держать в течение 5 дней при хранении в комнатной температуре. Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 ° С в водяной бане. После первого вскрытия концентрата стабилен до истечения срока годности

6.6. ТМВ Раствор субстрата

Бутылка содержит 15 мл перекиси тетраметилбензидина / водорода. Реагент готов к использованию и должен храниться при температуре 2 ... 8 ° С, вдали от света. Раствор должен быть бесцветным или может иметь небольшой синий оттенок. Если субстрат превращается в синий, он может быть негоден и должен быть утилизирован. После первого вскрытия годен до указанного срока годности при хранении при 2 ... 8 ° С.

6.7. Стоп-раствор

Бутылка содержит 15 мл 0,2 М раствора серной кислоты (R 36/38, S 26). Этот готовый к использованию раствор должен храниться при температуре 2 ... 8 ° С.

После первого вскрытия годен до истечения срока годности.

7. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Используйте сыворотку или плазму для анализа. Избегайте повторного замораживания и оттаивания.

Тепловая инактивация образцов не рекомендуется.

7.1. разбавление образца

Перед анализом все образцы должны быть разбавлены 1 + 100 разбавителем образца. Разлить по 10 мкл образца и 1 мл раствора для разведения образцов в пробирки для получения 1 + 100 разбавления и тщательно перемешать с Vortex.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

8.1. Подготовка к тестированию

Пожалуйста, тщательно прочитайте протокол тестирования перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от строгого соблюдения протокола испытаний, как описано. Следующая процедура анализа действительна только для ручной процедуры. При проведении испытания на автоматических системах ELISA мы рекомендуем увеличить промывки от трех до пяти, а объем промывочного раствора - от 300 мкл до 350 мкл, чтобы избежать отрицательных эффектов. До начала анализа : распределение, план идентификации образцов и контроли должны быть тщательно установлены на листе результатов поставляемых в комплекте. Выберите требуемое количество микротитровальных полосок или лунок и поместите их в держатель.

Пожалуйста, разместите:

- 1 лунка (например, A1) для субстрата,
- 1 лунка (например B1) для отрицательного контроля,
- 2 лунки (например, C1 + D1) порогового контроля
- 1 лунка (например, E1) для положительного контроля.

Рекомендуется определять контроли и образцы в двух экземплярах.

Выполните все шаги теста в указанном порядке и без каких-либо заметных задержек между шагами.

Чистый, одноразовый наконечник должен быть использован для дозирования каждого контроля и образца.

Отрегулируйте инкубатор 37 ± 1 ° С.

1. Внесите 100 мкл контроля и разбавленных образцов в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для субстрата.

2. Накрыть лунки фольгой, поставляемой в комплекте.
 3. Инкубировать в течение 1 часа \pm 5 мин при температуре 37 ± 1 ° C.
 4. После инкубации удалите фольгу, удалите содержимое лунок и промойте каждую лунку три раза 300 мкл промывочного раствора. Избегайте переполнения лунок. Время выдержки между каждой промывкой должна быть > 5 сек. В конце осторожно удалить остатки жидкости на стрипах на салфетку перед следующим этапом!
- Примечание: Промывка очень важна! Недостаточная промывка приводит к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.
5. Распределить 100 мкл VetLine Aspergillus Белок А / G конъюгата во все лунки (например, А1). Закрыть с фольгой.
 6. Инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре. Не подвергать воздействию прямых солнечных лучей.
 7. Повторите шаг 4.
 8. Внесите 100 мкл ТМВ раствора субстрата во все лунки
 9. Инкубировать ровно 15 минут при комнатной температуре в темноте.
 10. Внесите 100 мкл Стоп-раствора во все лунки в том же порядке и с той же скоростью, что и для ТМВ раствора субстрата.

Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтый.

Примечание: высоко-положительные образцы могут иметь темный осадок хромогена! Эти преципитаты могут влиять на оптическую плотность. Предварительное разбавление образца физиологическим раствором хлорида натрия, например, 1 + 1, рекомендуется. Затем разбавить образец 1 + 100 с буфером для разведения и умножить результаты в ОД на 2.

11. Измеряют абсорбцию образца при 450/620 нм в течение 30 мин после добавления стоп-раствора или читают результаты визуально.

8.2. Измерение

Отрегулируйте микролуночные планшет-ридер ELISA до нуля, используя бланк субстрата в лунке А1.

Если - по техническим причинам - ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрата в лунке А1, вычсть значение абсорбции лунки А1 из всех остальных значений абсорбции, чтобы получить достоверные результаты!

Измерить абсорбцию во всех лунках при длине волны 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца в плане распределения и идентификации.

Двойное считывание длины волны 620 нм в качестве эталонной длины волны рекомендуется.

Там, где это применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

9. РЕЗУЛЬТАТЫ

9.1. Запуск критериев достоверности

Для того что бы анализ считать действительными, следующие критерии должны быть соблюдены:

Бланк субстрата в А1: значение абсорбции $< 0,100$.

Отрицательный контроль в В1: значение абсорбции $< 0,200$ и $< \text{cut-off}$

Cut-off контроль в С1 и D1: значение абсорбции $0,150 - 1,30$.

Положительный контроль в Е1: значение абсорбции $> \text{cut-off}$.

Если эти критерии не выполняются, тест не является действительным и должен быть повторен.

9.2. Подсчет результатов

Cut-off (отсечка) это среднее значение поглощения Cut-off контроля.

Пример: значение абсорбции Cut-off контроля 0,39 + значение абсорбции Cut-off контроля 0,37 = 0,76
 $0,76 / 2 = 0,38$

Пороговые = 0,38

9.3. Интерпретация результатов

Образцы считаются положительными, если значение оптической плотности выше, чем 10% по сравнению с Cut -off.

Образцы со значением оптической плотности на 10% выше или ниже cut-off не следует рассматривать явно положительным или отрицательным

-Серая зона

Рекомендуется повторить тест еще раз 2 - 4 недели спустя с новым образцом. Если результаты во втором тесте снова в серой зоне - образец должен быть рассмотрен как отрицательный.

Образцы считаются отрицательными, если значение оптической плотности ниже на 10% чем cut-off.

9.3.1. Результаты в NovaТес единицах

- значение оптической плотности $\times 10 = [\text{НоваТек-Units} = \text{NTU}]$

отсечка

Пример: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ NTU}$ (НоваТек Units)

Пороговые: 10 NTU

Серая зона: 9-11 NTU

Отрицательный: <9 NTU

Положительный: > 11 NTU

10. КОНКРЕТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Данные о производительности были установлены с образцами отдельных видов млекопитающих. Из-за природы конъюгата белка А / G этот ИФА должен вступать в реакцию с другими ветеринарными образцами также. Более подробная информация предоставляется по запросу.

10.1. Точность

Intraassay		Среднее	CV (%)
Pos. Serum	3	21,9	9,8
<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	8	0,15	6,8
	8	1,03	1,6

10.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность анализа отрицательного результата при отсутствии конкретного аналита.

Это > 95%.

10.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность положительного анализа положительного результата в присутствии конкретного аналита.

Это > 98%.

10.4. Интерференция

Интерференция с гемолитической, липемической или желтушной сывороткой не наблюдается вплоть до концентрации 10 мг / мл гемоглобина, 5 мг / мл триглицеридов и 0,2 мг / мл билирубина.

Примечание: Результаты исследования относятся к группам исследованных образцов; это не гарантируется спецификацию.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образца может повлиять на значения абсорбции. Диагноз инфекционного заболевания не могут быть установлены на основе единого результата теста. Точный диагноз должен учитывать историю болезни, симптоматику, а также серологические данные.

12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Все материалы должны рассматриваться и обрабатываться как потенциально инфицированные.

Все компоненты человеческого происхождения используемые для производства этих реагентов были протестированы на антитела к ВИЧ, антитела-НСV и HBsAg и были признаны как инактивированные. Не путайте реагенты или стрипы из разных партий продукции.

Не используйте реагенты других производителей с реагенты данного набора.

Не использовать реагенты по истечении срока годности, указанного на этикетке.

Используйте только чистые наконечники пипеток, дозаторов и лабораторный инвентарь.

Не путать колпачки реагентов во избежание перекрестного загрязнения.

Закрывать ампулу с реагентами плотно сразу после использования во избежание испарения и микробного загрязнения.

После первого вскрытия и последующего хранения проверять конъюгат и флаконы для контроля микробного загрязнения перед дальнейшим использованием.

Чтобы избежать перекрестного загрязнения и ложно завышенных результатов-распределять образцы и раскапывать конъюгат без расплескивания на дно лунок.

Процедура ELISA предназначена только для квалифицированного персонала, которые знакомы с надлежащей лабораторной практикой.

ВНИМАНИЕ: В используемой концентрации Bronidox L не имеет почти никакого **1**

13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Prod. No .: PAIVT0360 VetLine Parainfluenza ИФА (96 определений стриппы)

Производитель:	Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации:
NovaTec Immundiagnostica Gmb Waldstraße 23 A6 63128 Dietzenbach, Германия Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629 Email : info@NovaTec-ID.com	ЗАО «Биоград» Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский проспект, д. 14, литер А, офис 19-Н. тел/факс: +7 (812) 325 21 70 http://www.biograd.ru biograd@biograd.ru