

# VetLine *Dirofilaria* ELISA

Ферментный иммуноанализ для качественного определения антител против диروفиларии в ветеринарной сыворотке млекопитающих.

**Диагностическое использование только ин витро для ветеринарии.**

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Дирофиляриоз - паразитарное заболевание, вызванное нематодой *Dirofilaria* spec. Наиболее важными видами *Dirofilaria* у собак являются *Dirofilaria immitis* (heartworm) и *Dirofilaria repens*, возбудитель кожного филариоза.

Существует более 70 различных видов moskitov, которые, как известно, являются потенциальными векторами заболевания. Сердечные черви эндемичны в тропических и субтропических районах, а также в Южной и Юго-Восточной Европе, включая все средиземноморские страны. *Dirofilaria repens* встречается чаще в Италии и России, но также во Франции, Греции, Испании, Португалии и Венгрии. Инкубационный период длится от нескольких недель до нескольких месяцев. Клиника:

Тяжесть болезни сердечного червя зависит от продолжительности заражения и степени заражения червями. При низкой зараженности инфекция часто остается необнаруженной из-за отсутствия симптомов. Собаки могут проявлять только потерю силы или во время кашля и проблем с дыханием. В случае сильной инвазии это приводит к тяжелым сердечным и легочным симптомам с одышкой и кашлем с кровавой мокротой. Легочный отек и асцит являются типичными проявлениями. Часто наблюдается прогрессирующее разрушение клеток печени и, в конечном итоге, печеночная недостаточность. Внезапная смерть червей может вызвать сосудистую и легочную эмболию. Личинки инфекционных личинок сердечного червя могут передаваться москитами людям. Такие инфекции очень редки и обычно бессимптомны.

*Dirofilaria repens* у собак вызывает зудящие поражения кожи, узлы кожи и абсцессы кожи.

Диагностика:

Обнаружение антигена (например, ELISA)

Обнаружение антител (например, ELISA / Lineblot)

Knott-Test

## 2. ПРИМЕНЕНИЕ

ELISA NovaTec VetLine *Dirofilaria* предназначен для качественного определения антител против *Dirofilaria* в ветеринарной сыворотке млекопитающих.

## 3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Качественное иммуоферментное определение антител против диروفиларии основано на методе ИФА (фермент-связанный иммуносорбентный анализ). Микротитровальными стрипованные лунки предварительно покрывают антигенами *Dirofilaria* для связывания соответствующих антител образца. После промывки лунок, чтобы удалить все несвязанные образцы, добавляется пероксидаза хрена (HRP), обозначенная конъюгатом белка А / G. Этот конъюгат связывается с захваченными специфическими антителами к *Dirofilaria*. Иммуный комплекс, образованный связанным конъюгатом, визуализируется добавлением раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМВ), который дает голубой продукт реакции. Интенсивность этого продукта пропорциональна количеству специфических антител к диروفиларии в образце. Для прекращения реакции добавляют серную кислоту. Это создает желтый цвет конечной точки. Абсорбцию при 450 нм считывают с помощью считывателя микропланшетов ELISA.

## 4. МАТЕРИАЛЫ

4.1. Реагенты поставляются

VetLine *Dirofilaria* покрытые лунки: 12 рядный планшет с 8-ью хорошо отламывающимися полосками, покрытыми *Ascaris* антигеном; закрытый алюминиевой фольгой.

Разбавитель образца \*\*: 1 флакон, содержащий 100 мл буфера для разведения образцов; pH 7,2 ± 0,2; желтого цвета; готов к использованию; белый колпачок.

Стоп-раствор: 1 флакон, содержащий 15 мл серной кислоты, 0,2 моль / л; готов к использованию; Красный колпачок.

Промывочный раствора (20x конц.) \*: 1 флакон, содержащий 50 мл 20-кратного концентрированного буфера (pH 7,2 ± 0,2) для промывки лунок; белый колпачок.

VetLine *Dirofilaria* протеин А / G конъюгат \*\*: 1 флакон, содержащий 20 мл пероксидазы протеина А / G; окрашен в желтый цвет, готовый к использованию; белый колпачок.

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

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

VetLine *Dirofilaria* Производственный контроль \*\*: 1 флакон, содержащий 3 мл; желтого цвета; готовый к использованию; зеленый колпачок.

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

\* Содержит 0,1% Вронидох L после разбавления

\*\* Содержит 0,1% Катон

4.2. Материалы поставляются:

1 стрип-держатель

1 крышка из фольги

1 Протокол анализа

1 р план идентификации и распределение

4.3. Необходимые материалы и оборудование

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

Инкубатор 37 ° С

Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок

Пипетки объемом от 10 до 1000 мкл

Смеситель вихревой тубы

Деионизованная или (свеже) дистиллированная вода

Одноразовые трубки

Таймер

## 5. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Реагенты стабильны до даты, указанной на этикетке при хранении при 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 *Ascaris* антигеном.

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

6.2. *Dirofilaria* белок A/G конъюгат

Бутылка содержит 20 мл раствора с белком A / 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 ° С.

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 (20хсопс.)

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.

#### 6.6. ТМВ Раствор субстрата

Бутылка содержит 15 мл перекись тетраметилбензидин 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 заражен и должны быть выброшены. После первого вскрытия годен до указанного срока годности при хранении 2 ... 8 ° С.

#### 6.7. Стоп-раствор

Бутылка содержит 15 мл 0,2 М раствора серной кислоты (R 36/38, S 26). Это 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 ветеринарные образцы сыворотки млекопитающих с этим анализом. Избегайте повторного замораживания и оттаивания.

Тепловая инаktivация образцов не рекомендуется.

#### 7.1. разбавление пробы

Перед тем как опробовать все образцы должны быть разбавлены 1 + 100 с разбавителем образца. Разлить по 10 мкл пробы 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 контроля 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  $37 \pm 1$  ° С.

1. Внести 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  $37 \pm 1$  ° С.

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 Ascaris Белок A / G конъюгата во все лунки (например, A1). 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 A1.

Если - по техническим причинам - ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрата в лунке A1, вычтите значение абсорбции лунки A1 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. РЕЗУЛЬТАТ

### 9.1. Выполнить критерии проверки

Для того, чтобы анализ считался действительным, должны быть соблюдены следующие критерии:

Заготовка субстрата в A1: Значение абсорбции <0.100.

Отрицательный контроль в B1: Значение абсорбции <0.200 и <cut-off (отсечка)

Контроль отсечки в C1 и D1: Значение абсорбции 0,150 - 1,30.

Положительный контроль в E1: Значение абсорбции > отсечка.

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

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

### 9.2. Расчёт результатов

Пример: значение абсорбции.

Контроль отсечки 0,39 + значение поглощения. Контроль отсечки  $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Отсечка ( пороговое значение) = 0,38

### 9.3. Интерпретация результатов

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

Образцы со значением оптической плотности на 10% выше или ниже отсечки 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 отсечка.

#### 9.3.1. Результаты в NovaTec единицах

$\frac{\text{Значение оптической плотности} \times 10}{\text{отсечка}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$

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

Отсечка( пороговое значение) :	10	NTU
серая зона:	9-11	NTU
Отрицательный:	< 9	NTU
Положительный:	>11	NTU

## 10. 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.

## 11. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 токсикологического риска при контакте с кожей и слизистыми оболочками!

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Серная кислота раздражает глаза и кожу. Хранить в недоступном для детей месте.

При контакте с глазами, тщательно промыть водой и обратиться к врачу!

#### 11.1. Утилизация отходов

Остатки химических веществ и препаратов, как правило, рассматриваются как опасные отходы. Утилизация такого рода отходов регулируется в рамках национальных и региональных законов и нормативных актов.

Обратитесь к местным властям или компаний по вывозу и утилизации отходов.

## 12. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Prod. No .: FILVT0760

VetLine Dirofilaria ИФА (96 определений)

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