

***ImmunoComb*®**

CANINE LEPTOSPIRA

ANTIBODY TEST KIT

Инструкция

18.12.08

Предназначен для 12/120 исследований

I. Назначение

Бесприборная иммуноферментная тест-система Canine Leptospira предназначена для определения титров антител различных патогенных серотипов *Leptospira interrogans* в сыворотке крови собак. Смесь антигенов: *L. ichterohaemorrhgiae* (copenhageni и RGA), *L. canicola*, *L. pomona* и *L. grippotyphosa* связывается с антителами к наиболее распространенным вариантам, выявляемым у собак. Положительный результат указывает на текущую инфекцию. Тест-система не предназначена для выделения конкретного серотипа и для мониторинга вакцинации.

II. Общая информация

Лептоспироз — это спирохетная болезнь, распространенная по всему миру у многочисленных животных, является важным зоонозным заболеванием. По всему миру увеличивается рост зарегистрированных случаев. Различные серотипы *Leptospira interrogans* сохраняются в природе у многочисленных лептоспираносителей диких и домашних животных (резервуарные хозяева). Резервуарные хозяева являются источником инфекции для людей и других животных.

Собачий лептоспироз наблюдается чаще всего у охотничьих и спортивных собак, которые могут съесть диких животных, или же у собак, которые имеют доступ к лесистой местности с речными берегами или болотом. Стоячая вода является естественной средой для *Leptospira*. Инфекция передается при прямом контакте с заражённой мочей, трансплацентарным или же венерическим путем. Косвенное инфицирование также возможно через зараженную воду, растения, почву или продукты питания.

Leptospira не размножаются вне организма хозяина и их выживание зависит от экологических условий, в которых они были найдены. *Leptospira* чувствительны к высушиванию, кроме того, на них может пагубно влиять изменение pH. Заболеваемость Лептоспирозом увеличивается в сезон дождей, когда много стоячей воды и в болотистых условиях. При попытке борьбы с этим заболеванием были разработаны программы вакцинации. Однако вакцина не всегда содержит соответствующие серотипы, и длительность иммунитета обычно составляет очень короткое время (6-12 месяцев).

III. Что такое ImmunoComb

Тест ImmunoComb[®] является модифицированным иммуноферментным анализом (ИФА), который может быть описан как точечный анализ с использованием вторичных антител, меченных ферментом, при котором определяется уровень антител в сыворотке или цельной крови. Набор содержит все необходимые реагенты для выполнения теста. Результаты по Лептоспирозу собак доступны в течение 20 минут.

IV. Как работает ImmunoComb

- Набор ImmunoComb[®] содержит два основных компонента: Гребень в виде пластиковой карты, далее Гребень и Проявочную ванну.

- Гребень имеет 12 зубцов, рассчитанных на 12 тестов. Каждый зубец последовательно проходит через все соответствующие ячейки каждого ряда Проявочной ванны. Для индивидуального или группового исследования отламывается необходимое количество зубцов Гребня.
- Диагностическая точка смешанных сероваров нанесена на нижнюю точку каждого зубца Гребня. Верхняя точка — Положительный контроль.
- На первом этапе образец сыворотки, плазмы или цельной крови вносится в ячейку ряда А Проявочной ванны.
- Далее Гребень вставляется в ячейку с образцом и переносится в оставшиеся ячейки через определенный интервал времени в соответствии с инструкцией (п. VII). Специфичные IgG антитела из образца при их наличии связываются с антигеном на точке зубца Гребня.
- Гребень переносится в следующую ячейку (ряд В), где вымываются не связавшиеся антитела.
- Гребень вставляется в следующую ячейку (ряд С), которая содержит антитела к IgG антителам собаки, помеченные ферментом, которые связываются с комплексом антиген-антитело на зубце гребня.
- После еще двух промывок (ряд D и E) Гребень переносится в следующую ячейку (ряд F), где проявляется цвет благодаря ферментативной реакции.
- Интенсивность цвета результата соответствует уровню антител в тестируемом образце. Результаты оцениваются с использованием точки Положительного контроля и калибровочной шкалы CombScale.

V. Клинические признаки

В зависимости от серогруппы возбудителя, степени его вирулентности, величины заразной дозы, а также состояния специфического иммунитета и резистентности организма лептоспироз у собак может протекать в различных формах: острой, подострой, хронической и латентной (бессимптомной). Основными критериями тяжести болезни являются степень выраженности геморрагического синдрома, поражения почек и печени (интенсивность желтухи).

В связи с этим выделяют у собак геморрагическую и желтушную формы лептоспироза.

У беременных самок могут происходить аборт. Распространенность Лептоспироза у собак может быть недооценена из-за протекания инфекции без симптомов (латентная форма).

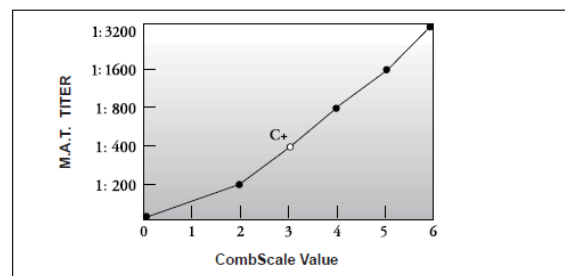
VI. Диагностика

Диагностика Лептоспироза собак в основном основывается на клинических признаках заболевания. При постановке диагноза используют серологические исследования. Стандартным лабораторным методом серологического диагноза Лептоспироза является Реакция Микроагглютинации (РМА). Значительным считается четырехкратное превышение титра антител к сероварам (серотипам) *Leptospirosis*. Из-за кросс-реактивности (перекрестной реакции) могут наблюдаться повышенные титры на несколько сероваров. Если имеются положительные кросс-реакции, серовары с наиболее высоким титром считаются наиболее значимыми.

Тест ИммуноКомб, основанный на точечном иммуноферментном анализе, является более чувствительным, чем РМА, но пока не позволяет различать специфичные серотипы. Тест набор ИммуноКомб для диагностики собачьего Лептоспироза подходит для обнаружения повышения титра антител на инфекцию с любым из следующих сероваров: *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* и *L. grippityphosa*, которые являются наиболее часто встречаемыми.

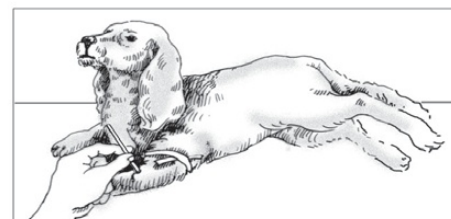
РИС.1: Соотношение между «S» значениями на COMBSCALE и титра по РМА

FIG.1: RELATIONSHIP BETWEEN THE COMBSCALE'S "S" VALUE AND THE M.A.T. TITER

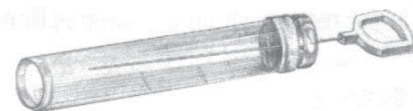


VII. Процедура анализа на ИммуноКомб®

Анализ проводится при температуре 20°-25°С (68°—77°F).



1. Забрать образец крови у собаки

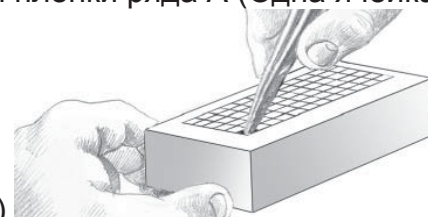


2. Используйте пипетку или капилляр*.

При тестировании цельной крови используйте 10 мкл

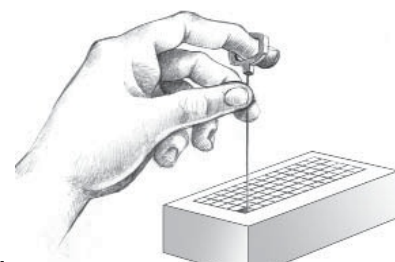
При тестировании сыворотки/плазмы используйте 5 мкл

3. Используйте пинцет для вскрытия алюминиевой защитной пленки ряда А (Одна ячейка



для одного образца)

4. Внесите образец в ячейку ряда А. Для перемешивания поднимите и опустите

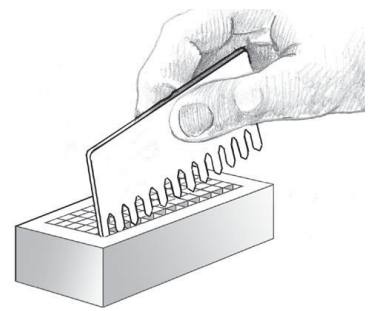


пипетку/поршень несколько раз.

Не открывайте ячейки ряда А или других рядов, которые вы не собираетесь использовать.

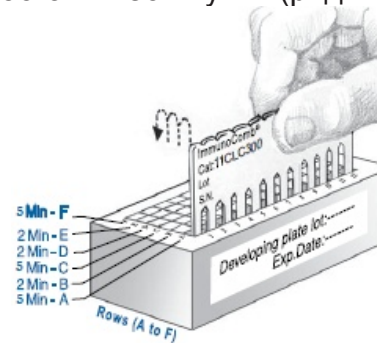
По запросу можно приобрести набор из 40 капилляров и 1 поршня.

5. Выньте гребень из защитной обертки. Для тестирования менее 12 образцов, разрежьте или отломите Гребень по меткам в зависимости от количества тестов. Вставьте Гребень в открытую ячейку ряда А (печатной стороной к себе) и инкубируйте 5 минут. Для улучшения перемешивания аккуратно передвигайте гребень вверх вниз в начале каждой инкубации (каждого ряда). Повторите это движение как минимум дважды во всех остальных рядах.



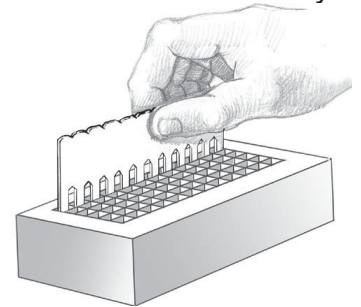
6. Используйте пинцет для вскрытия следующего ряда (ряд В), и вставьте Гребень на 2 минуты. До перенесения Гребня из одного ряда в следующий, вскройте последующий ряд.

Удалите капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня с помощью чистой фильтровальной бумаги. Не прикасайтесь к фронтальной поверхности Гребня. Вставьте Гребень в следующий ряд (ряд С) на 5 минут. Переместите Гребень в оставшиеся лунки (ряд D



и E) на 2 минуты, а в последнюю лунку (ряд F) на 5 минут.

7. По завершению проявления цвета в ряде F переместите Гребень обратно в ряд E на 2 минуты для фиксации цвета. Выньте Гребень дайте ему высохнуть в течение 1-10 минут.



VIII. Чтение и интерпретация результатов

– Верхняя точка должна дать пурпурно-серый цвет. Это тот же тон цвета, который создается при значительном положительном ответе. Эта точка должна читаться как S3 на шкале от S0 до S6 (S3 считается точкой отсчета уровня IgG антител, что примерно эквивалентно положительному иммунному ответу при титре 1:400 анализа РМА).

– Нижняя точка Гребня дает результаты реакции смешанных против-Лептоспирозных сероваров в образце теста. Сравните цвет нижней и верхней точек. Четкая, видимая пурпурно-серая точка показывает на положительный результат. Более темная точка, чем точка положительного контроля, указывает на высший титр. Более слабый цвет указывает на низкий ответ, который приблизительно равен от 1:100 до 1:200 титру РМА.

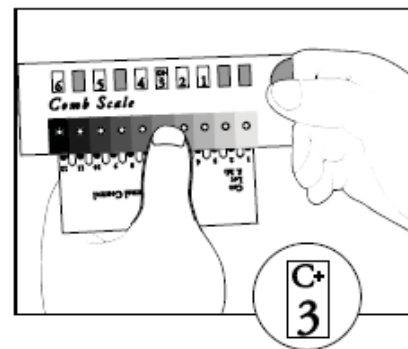
– Для оценки титра используйте CombScale, который входит в набор.

IX. Чтение результатов по шкале CombScale

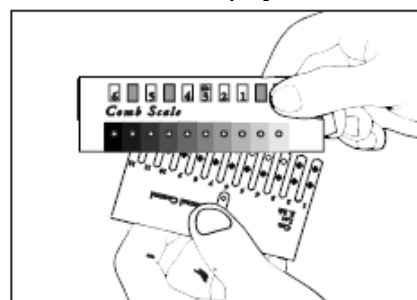
Значение S — это число, которое появляется в желтом окошке, соответствующем цвету тестовой точки при откалиброванном приборе по положительному контролю, соответствующему S3.

Когда Гребень полностью высохнет, откалибруйте его по шкале CombScale. Найдите тон пурпурно-серый на шкале, который наиболее близко подходит к точке Положительного Контроля (верхняя точка). Двигая желтую линейку, найдите отметку C+, появившуюся в окошке над цветом, который вы только что нашли.

Держите линейку в таком положении на протяжении всего чтения результатов. Этот шаг фактически калибрует C+ и S3, с которыми и будут сравниваться точки теста.



Удерживая линейку, найдите тон на шкале, который будет наиболее точно подходить к точке результата теста (нижняя точка). Значение, которое появится в окошке сверху, является

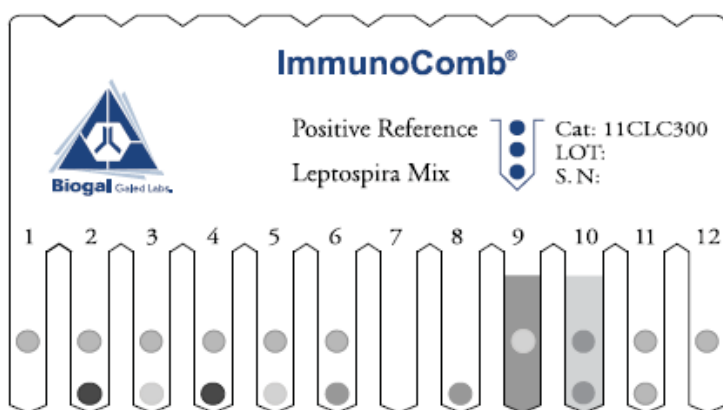


оценкой CombScale (S0-S6).

Повторите этот шаг с каждой точкой теста отдельно.

Другой способ чтения результатов — это использование прибора CombScan. Это программа, которая использует компьютер и TWAIN совместимый сканер. Когда Гребень помещается в сканер, программа считывает цветовой результат в числовом значении. CombScan помогает лаборатории в чтении результатов ImmunoComb и сохранении данных. Программа устанавливается бесплатно по запросу.

X. Пример использованного Гребня



Номер теста	Результат	
1	S0	Негативная реакция к Leptospira
2	≥ S5	Высокая положительная реакция к Leptospira
3	S1-2	Низкая положительная реакция к Leptospira
4	≥ S5	Высокая положительная реакция к Leptospira
5	S1-2	Низкая положительная реакция к Leptospira

6	$\geq S3$	Положительная реакция к <i>Leptospira</i>
7*		Неверно
8*		Неверно
9**		Неверно
10***	$\geq S3$	Положительная реакция к <i>Leptospira</i>
11	$\geq S3$	Положительная реакция к <i>Leptospira</i>
12	S0	Негативная реакция к <i>Leptospira</i>

Примечание:

* Нет Положительной Ссылки. Повторите тест.

** Высокий фон. Повторите тест.

*** Высокий фон с положительным результатом.

XI. Меры предостережения и хранение теста

1. Хранить набор при температуре 2-8⁰C. Не замораживать набор.
2. Перед проведением теста выдержите все элементы набора и исследуемые образцы при комнатной температуре примерно 60-120 минут (или инкубируйте Проявочную ванночку 22 минуты при 37⁰C). Исследование проводится при комнатной температуре. (20-25⁰C)
3. Избегайте утечки и перекрестного контаминирования растворов.
4. Перемешивайте реагенты путем переворачивания проявочной ванны несколько раз до использования.
5. Не смешивайте реагенты разных наборов или разных ячеек одного набора.
6. Не касайтесь зубцов Гребня.
7. При использовании проявочной ванны, вскрывайте покрытие каждой ячейки, строго следуя процедурным инструкциям. Не снимайте алюминиевое покрытие проявочной ванны все сразу.
8. Набор ИммуноКомб содержит инактивированный биологический материал. С набором следует обращаться и утилизировать его в соответствии с принятыми санитарно-гигиеническими нормами.

XII. Содержимое набора

Компоненты	Тест набор на 12 исследований (50LCL 201)	Тест набор на 120 исследований (50LCL210)
A. Гребень (в алюминиевой оболочке)	1	10
B. Проявочная ванна	1	10
C. Одноразовый пинцет	1	1
D. Прибор CombScale	1	1

Е. Набор из 12 капилляров и одного поршня	1	Под заказ
Инструкция	1	1

XIII. Литература

1). Noel R. (2002). An overview of canine leptospirosis.

<http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/noel/>

2). McDonough, P.L. (2001). Leptospirosis in dogs current status, Recent Advances in Canine Infectious Diseases. *International Veterinary Information Services*, July.

3). Levett, P. Leptospirosis. (2001). *Clinical Microbial Reviews*, **14(2)**, 296-326.

<p>Производитель: Biogal – Galed Labs, Galed 19240 M.P. Megidol, Израиль Tel: 972-4-9898605 • Fax: 972-4-9898690 E-mail: Info@biogal.co.il • Site: www.biogal.co.il</p>	<p>Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации: ЗАО «Биоград» Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н. тел/факс: +7 (812) 325 21 70 http://www.biograd.ru biograd@biograd.ru</p>
--	--