



AGROLABO
FilarCHECK Ag ELISA

FilarCHECK Ag ELISA

Kit ELISA per la determinazione degli antigeni di Dirofilaria immitis nel siero o plasma di cane

PRINCIPIO DEL TEST

Il test è basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA diretta a doppio anticorpo monoclonale. Un anticorpo monoclonale specifico contro l'antigene di Dirofilaria immitis è adeso ai pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare. Se il campione in esame contiene l'antigene di Dirofilaria immitis, questo si legherà all'anticorpo adeso, formando il complesso Ag-Ab. Viene aggiunto il secondo anticorpo monoclonale anti-Dirofilaria immitis coniugato con perossidasi di rafano. Dopo un lavaggio per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato che si legherà esclusivamente al coniugato, sviluppando una reazione colorimetrica.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti divisibili)
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso
- 1 flacone di coniugato - pronto all'uso
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X
- 1 flacone di substrato (TMB) - pronto all'uso
- 1 flacone di soluzione di stop - pronto all'uso

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Provette e tubi per la diluizione dei campioni, pipette di precisione e puntali, spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

PRECAUZIONI

1. **Leggere accuratamente e attenersi alle istruzioni**
2. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit
3. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) 1 ora prima dell'esecuzione del test
4. Eseguire il test a temperatura ambiente e mantenerla costante per tutta l'esecuzione
5. Non utilizzare il kit ed i reagenti dopo la data di scadenza
6. Evitare stress termici: utilizzare tutti i reagenti per il tempo strettamente necessario al test e riporli in frigorifero a +2-8°C appena possibile
7. Estrarre solo le strip necessarie all'esecuzione del test, richiudere le rimanenti non utilizzate nell'apposita busta con dissecante, sigillare e conservare a +2-8°C
8. Preparare i campioni secondo le istruzioni: se possibile, evitare l'uso di campioni lipemici ed emolizzati
9. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo
10. Miscelare i reagenti prima dell'uso
11. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione e l'ordine di deposizione nella piastra
12. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione/reagente da analizzare, evitando la contaminazione
13. Il substrato TMB è molto sensibile alla luce e alle contaminazioni. Non inserire il puntale direttamente nel flacone. Maneggiare con cura

14. La soluzione di stop è un acido forte diluito. Maneggiare con cura
15. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C
16. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio

Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 9 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 100 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 900 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

Nota: la soluzione concentrata 10X può presentare un precipitato sul fondo della bottiglia, che può essere solubilizzato portando la soluzione a temperatura ambiente o ponendola a +37°C per 15 minuti circa.

LAVAGGIO DEI POZZETTI

Le operazioni di lavaggio possono essere effettuate con un lavatore automatico di piastre o con una pipetta multicanale in modo da dispensare un volume di 300 µl in ogni pozzetto. Dopo le incubazioni, le operazioni di lavaggio devono essere effettuate seguendo queste istruzioni:

- rovesciare il contenuto dei pozzetti in un apposito contenitore, con un movimento deciso al fine di evitare la contaminazione tra pozzetti adiacenti
- dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio diluita in ogni pozzetto
- agitare delicatamente la piastra, evitando contaminazione tra i pozzetti vicini
- rovesciare la piastra per svuotare i pozzetti
- ripetere il lavaggio tante volte quante indicate nelle istruzioni del kit
- prima dell'ultima operazione di rovesciamento della piastra, accertarsi che il reagente da utilizzare di seguito sia pronto
- non lasciare i pozzetti asciutti più del tempo necessario per dispensare il reagente del passaggio successivo
- dopo l'ultimo passaggio di lavaggio la piastra deve essere asciugata su un foglio di carta assorbente

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di siero o plasma di cane. Non è necessaria alcuna diluizione del campione. Dispensare direttamente 30 µl di campione in ogni pozzetto.

PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit 1 ora prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 30 µl di controllo positivo e 30 µl di controllo negativo in due pozzetti differenti. Distribuire in ogni pozzetto 30 µl dei campioni in esame negli altri pozzetti. Distribuire in ogni pozzetto 70 µl di coniugato, seguendo l'ordine con cui sono stati dispensati campioni e controlli.

Agitare delicatamente, coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente.

3. Lavare 5 volte seguendo la procedura di lavaggio.
4. Distribuire in ogni pozzetto 70 µl di substrato.

Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente al buio.

5. Procedere con la lettura visiva o spettrofotometrica come indicato nei punti A e B:

- A. Lettura visiva:** al termine dell'incubazione del substrato, **NON AGGIUNGERE** la soluzione di stop.
- B. Lettura spettrofotometrica:** al termine dell'incubazione del substrato, **AGGIUNGERE** 70 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

A. LETTURA VISIVA – Senza aggiungere la soluzione di stop

Al termine dell'incubazione del substrato, valutare visivamente la colorazione dei pozzetti. Il controllo positivo deve avere un colore blu/azzurro nettamente distinguibile dal controllo negativo, che deve risultare incolore.

Interpretazione dei risultati

Campioni POSITIVI: si evidenzierà lo sviluppo del colore azzurro nel pozzetto con un'intensità proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione.

Campioni NEGATIVI: non si avrà sviluppo di colorazione.

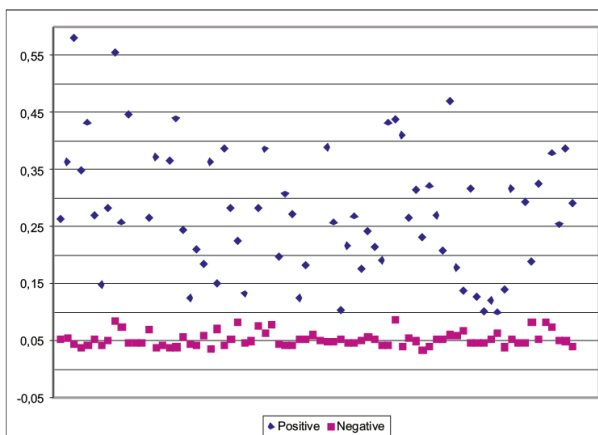
B. LETTURA SPETTROFOTOMETRICA – Aggiunta della Soluzione di stop

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Se i campioni sono stati condotti in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica sia dei campioni che dei controlli.

Interpretazione dei risultati

Campioni con valori di OD $\geq 0,100$ devono essere considerati positivi. (Vedere tabella 1).

Tabella 1



FilarCHECK Ag ELISA

Kit ELISA for the detection of Dirofilaria immitis antigen in canine serum or plasma samples

TEST PRINCIPLE

The test is performed as a direct sandwich enzyme linked immunosorbent assay (direct sandwich ELISA). A specific monoclonal antibody (Mab) against the antigen of *Dirofilaria immitis* is fixed on the wells of the plate. The samples to be analyzed are distributed in each well. If the sample contains the specific antigen of *Dirofilaria immitis*, the antigen will bind to the Mab adsorbed, forming the Ag-Ab complex. By adding a second Mab anti-*Dirofilaria immitis* (conjugated with horseradish peroxidase), this will bind to the Ag-Ab complex. All non-fixed material is removed by washing. A specific substrate is then added to the wells which causes a colorimetric reaction.

TEST COMPONENTS

- 1 x 48 or 96 wells plate (in strip of 8 breakable wells)
- 1 dropper of positive control - ready for use
- 1 dropper of negative control - ready for use
- 1 dropper of conjugate - ready for use
- 1 bottle of washing solution - 10X
- 1 dropper of substrate (TMB) - ready for use
- 1 dropper of stop solution - ready for use

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Test tubes for serum dilutions, precision pipettes and tips, spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

PRECAUTIONS

1. **Read carefully and follow the instruction for use**
2. Do not use reagents and instructions from other kits
3. Bring all reagents to room temperature (+20-25 °C) 1 hour before running the test
4. Perform the test at room temperature and keep it constant throughout the execution
5. Do not use kit and reagents after the expiration date
6. Avoid thermal stress: use all reagents for the time strictly necessary for the test and store them at +2-8 °C as soon as possible
7. Take out only the strips needed to perform the test, reseal the remaining unused ones in the appropriate bag with desiccant, seal and store at +2-8 °C
8. Prepare samples according to instructions: if possible, avoid using lipemic and hemolyzed samples
9. Always use the positive and negative control in each analysis
10. Mix reagents before use
11. Respect the times of each incubation and the order of deposition in the plate
12. Use a new tip for each sample/reagent to be analyzed, avoiding contamination
13. TMB substrate is very sensitive to light and contamination. Do not insert the tip directly into the vial. Handle with care
14. The stop solution is a strong diluted acid. Handle with care
15. All components should be stored at +2-8 °C
16. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer solution:

Dilute one part of the wash buffer supplied into 9 parts of distilled or deionized water (ie. 100 ml of concentrated wash buffer with 900 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution must be stored at +2-8°C.

Note: the 10X wash buffer solution may have some precipitates at the bottom of the bottle that can be solubilized by bringing the solution to room temperature or placing it at +37°C for about 15 minutes.

WASHING STEPS

The washing steps may be carried out using an automated plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well. After the incubation, the washing steps should be carried out according to the following instructions:

- throw out the content of the plate by vigorously turning the plate over to avoid the possible mixture of the content from one well to another
- dispense a volume of 300 µl of diluted wash buffer into each well
- shake the plate gently, avoiding contamination between wells
- turn over the plate and tap the wells vigorously to remove the wash buffer
- repeat the process as many times as is indicated by the kit's instructions
- prior to emptying out the plate's contents during the final washing step, ensure that the next reagent to be added to the plate is ready to use
- the wells should not be left dry for any longer than strictly necessary in order to dispense the reagent of the following step
- after the last washing step, blot the empty wells face down on clean paper towels or absorbent paper to remove residual wash buffer

PREPARATION OF SAMPLES

Canine serum or plasma samples.

Dilution of the samples is not necessary. Directly add 30 µl of sample to each well.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature 1 hour before use.
2. Dispense 30 µl of positive control and 30 µl of negative control in two different wells. Add 30 µl of each sample to the remaining wells of the plate. Dispense 70 µl of conjugate into each well, following the order in which the samples and controls were dispensed. **Delicately shake the plate, seal and incubate at room temperature for 10 minutes.**
3. Wash cycle 5 times according to the procedure previously described.
4. Add 70 µl of substrate in each well and delicately shake the plate. **Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes in the dark.**
5. Proceed with visual or spectrophotometric reading as explained in points A and B:

- A. Visual reading:** at the end of the incubation with substrate, read visually. Evaluating blue colour in the wells.
- B. Spectrophotometric reading:** at the end of the incubation with substrate, add 70 µl of stop solution to each well. Read the results with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

A. VISUAL READING - Without adding stop solution

The positive control must be blue/light blue and clearly distinguishable from the negative control, which should be colourless.

Interpretation of the results

POSITIVE samples: a blue colour will develop. Colour intensity is proportional to the quantity of antigen present in the sample.

NEGATIVE samples: no colour will develop.

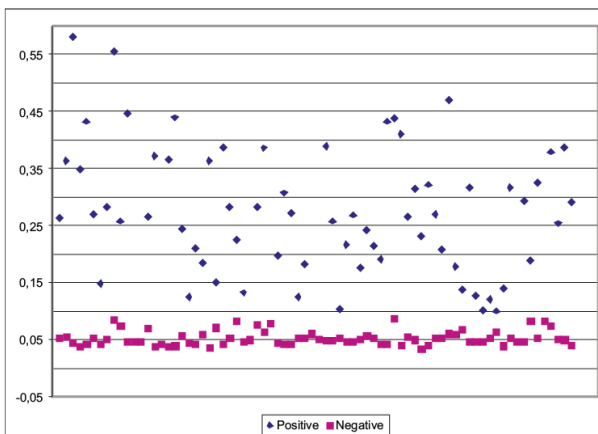
B. SPECTROPHOTOMETRIC READING - Add stop solution

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 450 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD values for the samples or controls will be the mean of both wells.

Interpretation of the results

Samples with OD values ≥ 0.100 must to be considered positive. (See Table 1).

Table 1





AGROLABO
FilarCHECK Ag ELISA

Manufactured by
Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories
and Production Centre
Diagnostic Division
Via Masero 59
10100 Scarmagno (TO)
Italy
Tel +39 0125 731111
E-mail agrolabo@agrolabo.it
www.agrolabo.it