



INGEZIM EHRLICHIA VET

Prod Ref: 15.EHR.K8-32

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto, para la detección de anticuerpos específicos frente a Ehrlichia en suero o plasma de perro

Indirect immunoenzymatic assay for detection of antibodies to Ehrlichia canis in dog serum or plasm.

Ultima revision 29-01-21 / Last revision: 29-01-21

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x4 pocillos) 1 plate box (8x4 wells)	
	Uni.	Vol.
Tiras de 8 pocillos (divisibles), que permiten la utilización parcial del kit, con antígeno de Erlichia Divisible strips of 8 wells each one coated with Ehrlichia canis antigen	4	-
Gotero Suero Control Positivo listo para su uso Dropper with of positive control, ready to use	1	1,5 ml
Gotero Suero Control Negativo listo para su uso Dropper with of negative control, ready to use	1	1,5 ml
Gotero Conjugado específico a la dilución de uso (atención, es de color rojo) Dropper with 1,5 ml of peroxidasa conjugate ready to use (RED COLOUR)	1	5 ml
Gotero cromógeno, a la dilución de uso. Dropper cromogen solution ready to use	1	3 ml
Gotero sustrato a la dilución de uso. Dropper of substrate solution ready to use	1	3 ml
Gotero diluyente de suero (DE03-01). Dropper of sera diluent (DE03-01)	1	6 ml
Gotero solución de frenado. Dropper of stop solution	1	6 ml
Frascos de Solución de lavado concentrada 10x. Bottles with 10x concentrated 1 washing solution	1	60 ml
Asas calibradas de 1 µl. Calibrated loops for dispensing the sera simples.	40	-

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Los animales afectados por Ehrlichia, desarrollan anticuerpos específicos frente a *E.canis*, que son los que se detectan en nuestro ensayo y sirven para el diagnóstico de la patología.

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto cuyo fundamento se detalla a continuación.

Las placas se suministran tapizadas con un antígeno específico de *E.canis*.

En cada pocillo se dispensan los sueros problemas a valorar. Cuando estos contengan anticuerpos frente al patógeno

se unirán al antígeno de la placa y tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de los mismos mediante la adición de un conjugado anti-IgG de perro marcado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos específicos presentarán una reacción coloreada, cuya densidad óptica será proporcional al título ó nivel de anticuerpos en suero.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización. **¡MUY IMPORTANTE!**
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer, beber, ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. Utilizar un asa nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.

III. CONSERVACION

Todos los reactivos que se suministran con el kit, deben mantenerse en refrigeración entre +2°C y +8°C hasta su utilización.

IV. INFORMACION SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante un frasco lavador o una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- ◆ Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- ◆ Distribuir la solución de lavado de forma uniforme y con presión sobre los pocillos a utilizar. Dosificar la Solución de Lavado, según número de pocillos usados.

INGEZIM EHRLICHIA VET 15.EHR.K8-32

- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- ◆ Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Para el ensayo de los sueros, se realiza la **dilución 1/100** de los mismos, mediante las asas calibradas y el diluyente de suero, de la manera indicada en el procedimiento.

VI. FORMA DE UTILIZAR EL ASA CALIBRADA:

- Utilizar un asa diferente por cada suero problema.
 - Para captar el volumen adecuado de suero, introducir únicamente el anillo final del asa en el recipiente que contiene la muestra.
- El volumen captado se deposita por simple introducción del anillo final del asa en el pocillo correspondiente, al que previamente se le ha añadido el diluyente de suero.
- La dilución se homogeneiza mediante giros suaves del asa en el interior del pocillo.

VII. PREPARACION DE REACTIVOS:

Todos los reactivos se encuentran en disposición de ser utilizados, sin precisar de manipulaciones previas, a excepción de la *Solución de Lavado* que se suministra 10 veces concentrada, por lo que debe diluirse antes de ser utilizada, del modo que se especifica a continuación:

Disolver una parte de solución concentrada en 9 partes de agua destilada. Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

Por ejemplo: 60 ml de solución concentrada mas 540 ml de agua destilada.

VIII. PROCEDIMIENTO:

1. Llevar todos los reactivos del kit a temperatura ambiente, antes de iniciar el ensayo.
2. Añadir **2 gotas** de diluyente de suero a cada pocillo donde vaya a ser testado un suero problema. Posteriormente y con ayuda del asa calibrada, captar **1 µl** de suero problema y depositarlo en los

pocillos donde se dispense el diluyente. Para homogeneizar la dilución, se realizan suaves giros con el asa dentro de cada pocillo. Los controles + y -, se encuentran a la dilución de uso y bastará con añadir **2 gotas** de cada uno, en dos pocillos elegidos para ello (sin añadir previamente diluyente de suero).

- Cubrir e incubar **10 minutos a temperatura ambiente.**
3. **Lavar 5 ó más veces** según instrucciones anteriores.
 4. Añadir **2 gotas** de Conjugado (anti-IgG de perro-Peroxidasa) a cada pocillo (atención, es de color rojo). Tapar e incubar **10 minutos a temperatura ambiente.**
 5. **Lavar 5 veces** según el procedimiento indicado.
 6. Añadir **1 gota** de cromógeno a todos los pocillos. A continuación, añadir **1 gota** de sustrato en el mismo orden. Agitar suavemente y mantener la reacción durante **5 minutos a temperatura ambiente.**
 7. Añadir **2 gotas** de solución de frenado y proceder a la lectura de los resultados

IX. LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

La lectura se realizará visualmente, determinando si existe o no-viraje de color (de incoloro a azul).

Validación del ensayo:

Tomamos para ello como referencia los controles.

- Control negativo: No debe existir viraje de color (incoloro).
- Control positivo: Debe existir viraje de color (azul).

En caso de no ser así, el ensayo no puede considerarse válido.

Interpretación de resultados:

- **Muestras negativas:** aquellas que no hayan virado de color (pocillo incoloro).
- **Muestras positivas:** aquellas en las que se detecta viraje de color (pocillo azul).
- El ensayo es válido únicamente como test cualitativo (positivo y negativo). Sin embargo, dado que el desarrollo de color es directamente proporcional al título de anticuerpos cuanto mas intenso sea el color obtenido mayor será el título de anticuerpos específicos de ehrlichia.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). We make a brief description of the technique below:

We fix the antigen on a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against *E.canis*, they will bind to the antigen adsorbed on plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera

sample, we can detect the presence of dog IgG using a specific peroxidase conjugate.

After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies against *E.canis* in the dog sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use. **IMPORTANT!**
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
7. Use a new loop for each sera sample.
8. For each utilization of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.

III. STORAGE OF COMPONENTS

The reagents must be storage between +2°C and +8°C.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps could be done using a washing solution bottle or an automatic washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the next instruction:

- Throw out the content of the plate by a brusque turn over of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- Dispense the washing solution (prepared following instructions), proportionally to the wells used.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells. Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as much times is indicated on the instructions of the kit.
- Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use.
- Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

The sera samples need to be at **1/100** dilution in sera diluent to be tested. You get it using the calibrated loop and following the instruction

VI. WAY TO USE THE CALIBRATED LOOPS:

- ◆ Use one different calibrated loop for each sera sample.
- ◆ For taking the adequate volume introduce only the final loop into the sample container.
- ◆ The captured volume is deposited by simple introduction of the loop into the appropriate well (previously has been add the sera sample diluent).
- ◆ The dilution is homogenized by soft turns of the loop into the well.

VII. PREPARATION OF REAGENTS:

All the reagents are ready to use, without any previous manipulation. Only the washing solution is 10 x concentrated.

9 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

- **Washing solution preparation:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into

Example: 60 ml. of concentrated washing solution into 540 ml. of distilled or desionized water.

VIII. PROCEDURE:

1. Take out the strips or wells to be used and keep it at least 2 hours at room temperature before starting the test.
2. Add **2 drops** of serum diluent on every well where serum samples are going to be tested. Then and using the calibrated loops, add **1 µl** of serum sample on each well following the previous instructions.
The positive and negative controls are ready to use and is only necessary add **2 drops** of each one on the remainder wells.
Seal the plate and **incubate for 10 minutes at room temperature.**
3. **Wash 5 or more times** following the described procedure.
4. Add **2 drops** of conjugate (RED COLOUR), to each well (controls and serum samples).
Seal the plate **and incubate for 10 minutes at room temperature.**
5. Wash 5 or more times following the described procedure.
6. Add **1 drop** of cromogen solution, to each well and **1 drop** of substrate solution in the same way. Keep the plate for **5 min at room temperature.**
7. Add **2 drops** of stop solution.
8. Read the results.

IX. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done by visual colour turn detection.

Kit validation:

We take the controls like reference.

- **Negative control:** There is no colour turn detection (transparent).
- **Positive control:** There is colour turn detection (blue).

Results Interpretation:

- **Negative samples:** There is no colour turn detection.

- **Positive samples:** There is colour turn detection.

▪ **ATTENTION**

The assay must be used as a **qualitative test** (positive / negative). Nevertheless and because the development of colour is directly proportional to the titre of antibodies, us much intense is the colour, us much titre of antibodies specific of ehrlichia will be.

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
Av.de la Institución Libre de Enseñanza, 39
8ª planta
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in

by:

