



# INGEZIM MOQUILLO IgM

Prod Ref: 15.CDM.K2

Ensayo inmunoenzimático de captura,  
para la detección y/o cuantificación de  
IgM específica frente al virus de  
Moquillo en suero de perro

Capture immunoenzymatic assay for  
specific IgM antibody detection to  
Canine Distemper Virus, in dog serum

Ultima revision / Last revision: 30-03-2022

Version 30-03-22:

Cambio en el antígeno recombinante a listo para su uso /  
*Change in recombinant antigen to ready to use*

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa dividida en tiras de 8 pocillos, antigenadas con AcM específico de IgM de perro Microtitration strip plate (8x12) coated with a dog IgM-specific Mab	1	-
Vial Suero Control Positivo listo para su uso Vial of Positive Control serum ready to use	1	3,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials of Negative Control serum ready to use	1	3,5 ml
Fascos de Diluyente de suero y conjugado a la dilución de uso (DE01-01) Bottles with diluent ready to use (DE01-01)	1	125 ml
Vial con antígeno recombinante listo para su uso Vial recombinant viral antigen ready to use	1	12 ml
Vial Conjugado peroxidasa (AcM específico para el virus del Moquillo) concentrado 100x Vials with Peroxidase Conjugate 100x concentrated	1	350 µl
Fascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Fascos conteniendo sustrato TMB Bottles with substrate	1	15 ml
Fascos de Solución de Frenado a la dilución de uso (Ácido Sulfúrico) Bottles with Stop Solution (Sulphuric acid)	1	15 ml

## I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

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

En caso tanto de infección como primovacunación, existe una alta tasa de anticuerpos IgM frente al virus del Moquillo. Este tipo de anticuerpos son los detectados en nuestro ensayo

Las placas se suministran tapizadas con un anticuerpo monoclonal (AcM) específico de IgM de perro.

En cada pocillo se dispensan los sueros problema a valorar. Los anticuerpos IgM presentes en el suero serán capturados por el AcM de la placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno

viral recombinante (nucleocápsida) que quedará unido al pocillo solo si el suero contenía IgM específicas del virus del Moquillo. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de este antígeno mediante la adición de un AcM conjugado, específico de la nucleocápsida del virus del Moquillo, marcado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos IgM específicos presentarán una reacción coloreada, proporcional al título o nivel de anticuerpos, mientras que en los pocillos donde se hayan ensayado sueros negativos, no aparecerá reacción coloreada.

## II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización. **¡MUY IMPORTANTE!** Los tiempos de incubación en este ensayo son muy cortos y los reactivos han de estar perfectamente atemperados.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
5. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
6. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
7. La solución de frenado es un ácido fuerte, por lo que debe ser manipulado con precaución. En caso de contacto con piel y ojos, lavar inmediatamente con agua abundante.
8. El sustrato es muy sensible a la luz y las contaminaciones. Por ello se recomienda sacar del bote únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver al bote la solución sobrante.

## 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 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 unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

## INGEZIM MOQUILLO IgM 15.CDM.K2

- 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 (p. ej. 5 µl de suero en 495 µl de diluyente).

### VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado**  
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. al menos una semana
- **Antígeno**  
Se presenta listo para su uso. Añadir 100 µl/pocillo
- **Controles**  
Se presenta listo para su uso. Añadir 100 µl/pocillo
- **Conjugado**  
Hacer una dilución 1/100 en diluyente. Se recomienda diluir únicamente el volumen que vaya a ser utilizado ya que la solución sobrante ha de ser desechada: (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente es suficiente para una placa. Para una tira de 8 pocillos, 10 µl de conjugado en 1 ml de diluyente).

### VII. PROCEDIMIENTO

1. **SACAR DEL REFRIGERADOR LOS COMPONENTES DEL KIT Y EQUILBRAR A TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE EMPEZAR EL ENSAYO.**
2. Añadir 100 µl de cada muestra por pocillo, preparada según indicaciones previas. Añadir 100 µl de los controles sin diluir (se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles). **Cubrir e incubar 15 minutos a 37°C.**
3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.
4. Añadir 100 µl del antígeno. **Cubrir e incubar 15 min a 37°C.**
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de conjugado, diluido según instrucciones, a cada pocillo. **Cubrir e incubar 15 min a 37°C.**
7. Lavar 4 veces.
8. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos a temperatura ambiente.**
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.
10. Leer a 450 nm de longitud de onda en los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

La lectura se realizará a una **longitud de onda de:450 nm**

Como valor de cada muestra y controles se tomará la media aritmética del duplicado.

### Validación del kit:

**Abs<sub>450nm</sub> control positivo > 0.8**

**Abs<sub>450nm</sub> control negativo < 0.15**

### Interpretación de los resultados:

Con respecto al valor del control positivo, se determinará el siguiente punto de corte:

$$\text{Punto de corte} = \frac{\text{Abs control positivo} \times 0,2}{0,2}$$

Se considerarán:

**Muestras negativas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea menor o igual al punto de corte.

**Muestras positivas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea mayor al punto de corte.

Si se desea establecer una relación entre la absorbancia obtenida y su título en IFI, podemos distinguir dos clases de muestras:

**Títulos bajos/medios** (se corresponden con valores de IFI de 1/20-1/80). Estas muestras presentan valores de absorbancia entre el punto de corte positivo y el 70 % de la absorbancia del control positivo

**Títulos altos:** (se corresponden con valores de IFI  $\geq$  1/160). Estas muestras presentan valores de absorbancia mayores de 70% de la absorbancia del control positivo ( $0.7 \times \text{Abs. Control} +$ )

**A pesar de la buena sensibilidad y especificidad de esta prueba, es recomendable que todas las muestras positivas sean confirmadas utilizando otro método diagnóstico. El diagnóstico definitivo no se debe basar en un único resultado. En cualquier caso, estos resultados deberán contrastarse y relacionarse con otros datos importantes: historia del animal, vacunación y síntomas clínicos.**

## I. TECHNICAL BASIS

---

This kit is based on a capture enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

A Monoclonal antibody (Mab) specific for dog IgM is fixed on a solid support (polystyrene plate). When a dog serum is added, the IgMs present in the sample are captured by the Mab adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non fixed material from the serum sample, we add the viral antigen (recombinant nucleocapsid) which is captured by the IgM only if the dog serum sample contained specific immunoglobulin M to CDV.

After additional washing we add a peroxidase-conjugated Mab specific to CDV nucleocapside. After washing and addition of the substrate a colorimetric reaction will be developed which could be measured by an ELISA reader.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies IgM against the virus in the dog sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies.

The aim of this kit is to provide the users with a reliable diagnostic technique for this disease.

## 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. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. Use a new tip for each serum sample.
6. For each utilisation of the kit, control positive and negative sera must be tested in a systematic way.
7. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
8. Substrate is very sensitive to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

---

All reagents and components must be stored at 4 °C.

## IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

---

The washing steps could be done using an automatic washing machine 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 instructions:

- 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 a volume of 300 µl of washing solution on each well.
- Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate brusquely to empty the wells.
- Repeat the process as much times as 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:

Dilute the sera samples at **1/100** in kit diluent to be tested.

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

### Washing solution :

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 9 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable when is stored between +2°C y +8°C.

### Positive and Negative Control:

Controls are ready to use. Do not dilute.

### Recombinant viral antigen:

Antigen is ready to use. Do not dilute.

### Preparation of the conjugate: to make immediately before use.

Dilute 1/100 with diluent.

- The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is: 110 µl of conjugate in 11 ml of diluent.
- The necessary and sufficient quantity of conjugate for a 8 wells strip is: 10µl of conjugate in 1 ml of diluent.

Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

Shake very well the solution prior to use.

## VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents and wells to be used, must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive and negative controls to two different wells. Add 100 µl of each dilution of sera samples to test, prepared following the previous instructions. We recommend running sample and controls, in duplicates. Seal the plate and **incubate for 15 minutes at 37°C**.
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of antigen to each well. Seal the plate and **incubate 15 minutes at 37°C**
5. Wash 4 times following the described procedure
6. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 15 minutes at 37°C**.
7. Wash 4 times following the described procedure.
8. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature**.
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Read the absorbances with an ELISA reader at 450 nm. Within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with an ELISA reader at **450 nm**.

### Kit Validation:

The test is valid when:

**O.D positive control > 0.8**

**O.D negative control < 0,15**

### Results Interpretation:

Using the positive control value, the cut off points values must be calculated as follows:

**Cut off = O.D 450 nm positive control x 0.2**

### NEGATIVE SAMPLES:

Samples with an OD lower than the Cut off value.

### POSITIVE SAMPLES:

In spite of the good sensitivity and specificity of this test, all the positive samples should be confirmed with other diagnostic method. Definitive diagnostic must not be based on a unique test result. These results must be correlated with other data: animal history, vaccination, and clinical symptoms.

Samples with an OD higher than the Cut off value. In this case you could distinguish two kinds of samples:

- low-medium titres (corresponding to IFI values of 1/20-1/80). These samples show OD values between positive cut off and 70% of OD positive control.
- high titres (corresponding to IFI values  $\geq$  1/160). These samples show OD values higher than 70% OD of positive control (0.7 x OD of positive control)

Developed and manufactured in Spain by:

EUROFINS INGENASA, S.A.  
C. de los Hermanos García Noblejas 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](http://www.ingenasa.es)



Distributed in

by:

A large empty rectangular box with a blue border, intended for the distributor's name and contact information.