

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



## INGEZIM FIV

Prod Ref: 16.FIV.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto, para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente al virus de la Inmunodeficiencia Felina en suero y plasma

Indirect immunoenzymatic assay for specific antibodies detection to Feline immunodeficiency in at serum or plasm

Ultima revision / Last revision: 07-03-08

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa de poliestireno dividida en tiras de 8 pocillos que permite la utilización parcial de kit, tapizada con péptidos sintético de VIF Microtiter divisible plate (8x12 wells) coated with a FIV synthetic peptide	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
Vial Conjugado (antiespecie-Peroxidasa) concentrado 100 x Vial with Peroxidase Conjugate 100 x (concentrated)	1	350 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frascos de Diluyente de suero y conjugado a la dilución de uso (DE03-01) Bottles with serum diluent and conjugate (DE03-01) ready to use	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB), listo para su uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	15 ml
Frasco de solución de Frenado a la dilución de uso (Acido 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 indirecto cuyo fundamento se detalla a continuación.

En caso de infección por el virus de la inmunodeficiencia felina, la respuesta inmune del animal dará lugar a los anticuerpos específicos, que son a la postre los detectados en el ensayo. Al ser una patología para la que no existe vacuna, la detección de anticuerpos es definitiva para la confirmación diagnóstica. Las placas se suministran tapizadas con un péptido de gran capacidad antigénica.

En cada pocillo se dispensan los sueros problemas a valorar. Cuando estos contengan anticuerpos frente al virus, 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 antiespecie 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. 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!**
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
5. No comer, beber, ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
9. 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.
10. 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 componentes, deben ser almacenados en refrigeración ( entre +2°C y +8°C), Manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

## 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.

## INGEZIM FIV

### 16.FIV.K1

- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- 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 (**Por ej.:** 5µl de suero en 500 µl de diluyente). Para titular se pueden realizar las diluciones que se deseen en base 2 a partir de ésta.

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado:**  
Disolver una parte de solución concentrada en 9 partes de agua destilada (**Por ej.:** 100 ml de sol. De lavado concentrada con 900 ml de agua destilada). Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
  - **Preparación del conjugado:**  
Diluir a la 1/100 en el diluyente proporcionado.  
⇒ La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente.
  - **Preparación de Controles (+) y (-):**  
Los sueros controles vienen listos para uso (100 µl/pocillo). **NO DILUIR.**
- ⇒ La cantidad necesaria y suficiente para una tira de 8 pocillos es: 10 µl de conjugado en 1 ml de diluyente.
- Homogeneizar bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Llevar todos los reactivos del kit a temperatura ambiente, antes de iniciar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de cada muestra por pocillo, preparada según indicaciones previas. Añadir 100 µl de los controles. (se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles). Cubrir e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.
4. Añadir 100 µl de Conjugado (antiespecie-Peroxidasa) a cada pocillo, preparado según indicaciones previas.
5. Tapar la placa e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos a temperatura ambiente.** Para la realización de este proceso, resulta conveniente la utilización de una pipeta multicanal para agilizarlo.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.
8. Leer inmediatamente a 450 nm en un lector de ELISA 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 > 1.**
- ⇒ **Abs<sub>450nm</sub> control negativo < 0,20.**

### Interpretación de los resultados:

Con respecto al valor del control negativo, se determinarán los siguientes puntos de corte:

**Cut off negativo= Abs control negativo + 0,25**

**Cut off positivo= Abs control negativo + 0,3**

Se considerarán:

- ⇒ **Muestras negativas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea menor o igual al cut off negativo.
- ⇒ **Muestras positivas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea mayor o igual al cut off positivo.
- ⇒ **Muestras dudosas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> se encuentre entre los dos cut off. En estos casos, se recomienda valorar al animal transcurridas 3 ó 4 semanas. Si no hay seroconversión, es decir, su Abs<sub>450</sub> no aumenta por encima del cut off positivo, la muestra será negativa.

Si se titula el suero problema, el título será la última dilución cuya Abs<sub>450</sub> esté por encima del cut off positivo.

## 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 polystyrene plate. When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera sample, we can detect the presence of cat antibodies using a specific peroxidase conjugate.

After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which could be measured

by an spectrophotometer.

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

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

In our kit is important to remark the use of a synthetic peptide like antigen. This method warranties the total absence of infectivity in the kit.

## 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. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
6. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
9. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
10. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°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:

The sera samples need to be at **1/100 dilution** in diluent to be tested.

For titration we recommend assaying different two fold dilutions, starting from 1/100.

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

### Σ WASHING SOLUTION:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 9 parts of distilled or deionized water (i.e. 100 ml of concentrate and 900ml of water). When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

### Σ 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 an 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:

- All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 100 µl of positive and negative controls on two wells. Add 100 µl of each dilution of sera samples to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate (it is important to run duplicates for both controls and samples test). Seal the plate and incubate for **10 minutes at room temperature.**
- Wash 4 times following the procedure previously described.
- Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate for **10 minutes at room temperature.**
- Wash 4 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min** at room temperature.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the absorbances of each well with an spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

Samples with an OD higher than the positive cut off value.

### Kit Validation:

The test could be validated when:

- O.D 450 nm positive control >1.**
- O.D 450 nm negative control <0,2.**

### NEGATIVE SAMPLES:

Samples with an OD lower than the negative cut off value.

### Results Interpretation:

Taking the negative control value, the positive and negative cut off values must be calculated as follows:

$$\frac{\text{NEGATIVE CUT OFF:}}{\text{O.D 450 nm negative control} + 0,25}$$

$$\frac{\text{POSITIVE CUT OFF:}}{\text{O.D 450 nm negative control} + 0,3}$$

### DOUBTFUL SAMPLES:

Samples with an OD between both cut off. In these occasions, it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks. If there is no seroconversion and its OD is not higher than the positive cut off in this second test, the sample will be considered negative.

If you run the samples in duplicate wells, the OD value for the sample will be the mean of both wells.

### POSITIVE SAMPLES:

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.  
C/ Hnos. García Noblejas, 39  
28037- MADRID (SPAIN)  
Tif: +34 91368.05.01/04  
Fax: +34 91 408.75.98  
E-mail: [ingenasa@ingenasa.com](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)



Distributed in \_\_\_\_\_ by: