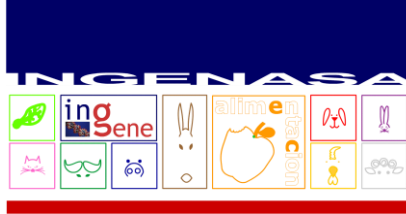


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



## INGEZIM MOQUILLO IgG

Prod Ref: 15.CDG.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto, para la detección y/o cuantificación de IgG específicas frente al virus de Moquillo en suero de perro

Indirect immunoenzymatic assay for detection of specific IgG antibody to Canine Distemper Virus in dog serum.

Ultima revision / Last revision: 23-09-08

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 una proteína recombinante de la nucleocápsida del virus. Microtitration strip plate (8x12) coated with a CDV recombinant protein	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 peroxidasa (anti-IgG canina.Peroxidasa) listo para su uso Vials with Peroxidase Conjugate (anti-canine IgG) ready to use	1	15 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frascos de Diluyente (DE01-01) Bottles with diluent (DE01-01)	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato TMB Bottles with substrate ready to use	1	15 ml
Frascos 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 tanto de infección como vacunación, existe una alta tasa de anticuerpos frente al virus de Moquillo. Este tipo de anticuerpos son los detectados en nuestro ensayo y son en gran medida responsables de los procesos de neutralización.

Las placas se suministran tapizadas con una proteína recombinante de la nucleocápside del virus.

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 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, 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!**
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 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 pocillo.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.

## INGEZIM MOQUILLO IgG 15.CDG.K1

- 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 500 µl de diluyente).

### VI. PREPARACION DE REACTIVOS

#### **Solución de lavado:**

Diluir 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.

### VII. PROCEDIMIENTO

1. **SACAR DEL REFRIGERADOR TODOS LOS COMPONENTES DEL KIT Y MANTENER A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE AL MENOS 1 HORA ANTES DE EMPEZAR 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 (anti-IgG canina) a cada pocillo.
5. Tapar la placa e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de 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 agilizar el proceso.
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 de longitud de onda en los 5 min.siguietes 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.

#### **Interpretación de los resultados:**

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

#### **Validación del kit:**

**Abs<sub>450nm</sub> control positivo > 1**  
**Abs<sub>450nm</sub> control negativo < 0.2**

**Cut off = Abs control positivo x 0,2**

Se considerarán:

**Muestras negativas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea  $\leq$  al cut off.

**Muestras positivas:** aquellas cuya Abs<sub>450</sub> sea  $>$  al cut off

**En este caso podemos distinguir tres clases de muestras:**

- **Bajo título** (se corresponden con valores de IFI de 1/20-1/40). Estas muestras presentan valores de absorbancia entre:

$$0.2 \times \text{Abs. Control} + \text{y}$$

$$0.4 \times \text{Abs. Control} +$$

- **Titulos medios** (se corresponden con valores de IFI de 1/80-1/160). Estas

muestras presentan valores de absorbancia entre:

$$0.4 \times \text{Abs. Control} + \text{y}$$

$$0.8 \times \text{Abs. Control} +$$

- **Titulos altos** (se corresponden con valores de IFI  $\geq$  1/320). Estas muestras presentan valores de absorbancia mayores de:

$$0.8 \times \text{Abs. Control} +$$

A pesar de la buena sensibilidad y especificidad de este test, 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, éstos resultados deberán contrastarse y relacionarse con otros datos importantes: historia del animal, vacunación y síntomas clínicos.

## 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 specific antigen on a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, 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 immunoglobulins using an 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 dog 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.

## 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. iIMPORTANT!**
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. Avoid any contamination of the reagents of the Kit. Take special care of substrate because is very sensitive to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

---

All reagents and plates must be stored between +2°C y +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.

## 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 and +8°C.

## VII. TEST PROCEDURE:

1. **ALL REAGENTS AND WELLS TO BE USED MUST BE ALLOWED TO COME TO ROOM TEMPERATURE BEFORE USE (AT LEAST FOR 1 HOUR).**
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, on the remainder wells of the plate. We recommend running the test (sample and control sera), in duplicates. Seal the plate and **incubate for 10 minutes at room temperature.**
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 10 minutes at room temperature.**
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the absorbances of each well 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 is >1**
- **O.D negative control is < 0,2**

### Results Interpretation:

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

#### CUT OFF:

$$\text{O.D 450 nm positive control} \times 0.2$$

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

#### + **NEGATIVE SAMPLES:**

Samples with an OD lower than the Cut Off value

#### + **POSITIVE SAMPLES:**

Samples with an OD higher than the Cut Off value. In this case you could distinguish three kind of samples

- **low titter** (corresponding to IFI values of 1/20-1/40). These samples show OD values between:  
0.2 x OD of positive control and  
0.4 x OD of positive control.
- **medium titres** (corresponding to IFI values of 1/80-1/160). These samples show OD values between:  
0.4 X OD of positive control and  
0.8 x OD of positive control
- **high titres** (corresponding to IFI values  $\geq$  1/320). These samples show OD values higher than,  
0.8 x OD of positive control

**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.**

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.  
C/ Hnos. García Noblejas, 39  
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:

