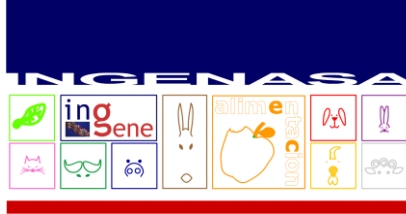


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



# INGEZIM EHRlichIA

Prod Ref: 15.EHR.K1

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

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

Ultima revision / Last revision: 10-12-07

COMPOSICION DEL KIT ELISA  
ELISA KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
12 Tiras de 8 pocillos que permiten la utilización parcial del kit, tapizada con antígeno de <i>E.canis</i> E. canis antigen coated strip plate	1	-
Vial Control positivo listo para su uso. Vial Positive control serum ready to use	1	3,5 ml
Vial Suero cut off listo para su uso . Vial Cut off serum ready to use	1	3,5 ml
Conjugado específico (ant-IgG de perro-Peroxidasa) concentrado 100x Vial with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	350 µl
Sustrato listo para su uso (TMB) Bottle with substrate TMB	1	15 ml
Solución de lavado 10x Bottle with 10x concentrated washing solution	1	100 ml
Diluyente de muestra listo para su uso (DE03-01). Bottle with diluent (DE03-01)	1	125 ml
Solución de frenado a la dilucion de uso (Ac.Sulfúrico). Bottle with stop solution (Sulphuric acid)	1	15 ml

## 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 al menos 2 horas 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
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 .

## 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:

- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- ◆ Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillo.
- 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.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.

## INGEZIM EHRlichIA 15.EHR.K1

- 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)..

### VI. PREPARACION DE REACTIVOS:

- **Solución de lavado:**

Diluir la solución a la 1:10 con agua destilada. (100 ml de concentrado + 900 ml de agua destilada). La solución así preparada permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

- **Preparación del conjugado:**

Diluir a la 1/100 en el diluyente

- La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente.

- 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.

- **Preparación de Controles (+) y (Cut OFF):**

- Los controles se suministran listos para su uso. No diluir.

### VII. PROCEDIMIENTO:

1. Equilibrar todos los reactivos (excepto el conjugado) a temperatura ambiente al menos 2 horas antes de comenzar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de cada muestra y de los controles por pocillo, preparados según indicaciones previas. (Se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles). Cubrir e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
3. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
4. Añadir 100 µl de Conjugado (antiespecie-Peroxidasa) a cada pocillo, preparado según indicaciones previas.

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 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:

Para que el ensayo se considere válido, ha de cumplirse la presencia de color tanto en los pocillos que contengan control positivo como suero cut off. El control positivo debe presentar una DO a 450nm mayor de 1 y el suero cut off mayor de 0.4.

### Interpretación de los resultados:

El suero cut off sirve para discriminar entre los sueros positivos y los negativos. Si dividimos el valor de DO de nuestras muestras entre el valor de absorbancia del Cut off obtendremos un índice:

### Índice de Positividad (IP)

Se considerarán:

- ⇒ **Muestras negativas:** aquellas cuyo índice así calculado sea  $<0.9$
- ⇒ **Muestras positivas:** aquellas cuya índice sea  $>1.1$
- ⇒ **Muestras dudosas:** aquellas cuyo índice se encuentre entre 0.9 y 1.1, se recomienda valorar otra muestra de suero del perro a los 4-5 días. Si su índice no es positivo, la muestra puede considerarse negativa.

El título de un suero se determina en función de su valor de **IP** ya que éste índice es proporcional al nivel ó título de anticuerpos en suero.

El suero control positivo presenta un **IP**  $> 2$

## 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 which could be measured by a spectrophotometer.

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. 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 cut off sera must be tested in a systematic way.
9. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
10. Substrate is very sensitive to light and contamination. Do not introduce pipettes into the bottle. Pour off the volume extricately needed.

## 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 needs to be at 1/100 dilution to be tested (5µl of serum in 0,5 ml of diluent)

## 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.

### ➤ **Preparation of the control sera (+) and CUT OFF**

Control sera are ready to use.

### ➤ **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 well 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. Bring all reagents at room temperature before starting the test. (at least. 2 hours)
2. Add 100 µl of positive control serum, to 2 wells of the first row of the plate and 100 µl of the cut off control serum to other 2 wells of the first row of the plate. Add 100 µl of sera samples to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate. (for confirmatory purposes test the samples in duplicate wells)  
Seal the plate and incubate for **10 min at room temperature (20-25°C)**.
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate for **10 min at 20-25°C (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**

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

### **Results Validation:**

The test is validated when:

- OD 450 Control (+) is higher than 1.0
- OD 450 Cut off serum is higher than 0.4

### **Results Interpretation:**

Cut off serum is used to discriminate between positive and negative samples. An index of positivity can be obtained applying the following formula:

$$\frac{\text{OD sample}}{\text{OD cutt off}}$$

Since the IP is proportional to the level of antibodies, a titre of the samples can be determined regarding this index.

The positive control 's IP must be >2

- **Indices from 0.9 to 1.1 should be considered doubtful.**
- **Indices above 1.1 are considered positive**
- **Indices below 0.9 are considered negative.**

---

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: