



AGROLABO
DISTEMPER IgG Ab ELISA

DISTEMPER IgG Ab ELISA

Kit ELISA per la determinazione degli anticorpi IgG anti-virus del Cimurro canino nel siero o plasma di cane

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA indiretta.

L'antigene del Virus del Cimurro canino (CDV) è adeso ai pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare. Se il campione in esame contiene specifici anticorpi IgG anti-CDV, questi si legheranno all'antigene adeso formando il complesso Ag-Ab. Dopo un primo ciclo di lavaggio effettuato al fine di eliminare tutto il materiale non legato, gli anticorpi anti-CDV presenti nel campione verranno evidenziati da un anticorpo monoclonale specifico anti-IgG canine, marcato con perossidasi di rafano. Dopo un secondo lavaggio viene aggiunto il substrato che, svilupperà una reazione colorimetrica in presenza del coniugato.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso;
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso;
- 1 flacone di coniugato - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X;
- 1 flacone di diluente - pronto all'uso;
- 1 flacone di substrato (TMB) - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop - pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Provette e tubi per la diluizione dei campioni; pipette di precisione e puntali; spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

PRECAUZIONI

1. Leggere attentamente le istruzioni.
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) prima dell'uso.
3. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit.
4. Il substrato è molto sensibile alla luce e alle contaminazioni. Non inserire il puntale direttamente nel flacone. La soluzione di stop è un acido forte diluito. Maneggiare i due reagenti con cura.
5. Non utilizzare i reagenti dopo la loro data di scadenza.
6. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso.
7. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo.
8. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione da analizzare.
9. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione.
10. Preparare i campioni secondo le istruzioni.
11. Evitare ogni contaminazione dei reagenti.
12. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C.

LAVAGGIO DEI POZZETTI

Le operazioni di lavaggio possono essere effettuate con un lavatore automatico di piastre o con una pipetta multicanale in modo da dispensare un volume di 300 µl in ogni pozzetto. Dopo le incubazioni, le operazioni di lavaggio devono essere effettuate seguendo queste istruzioni:

- rovesciare il contenuto dei pozzetti in un apposito contenitore, con un movimento deciso al fine di evitare la contaminazione tra pozzetti adiacenti,
- dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto,
- agitare delicatamente la piastra, evitando contaminazione tra i pozzetti vicini,
- rovesciare la piastra per svuotare i pozzetti,
- ripetere il lavaggio tante volte quante indicate nelle istruzioni del kit,
- prima dell'ultima operazione di rovesciamento della piastra, accertarsi che il reagente da utilizzare di seguito sia pronto,
- non lasciare i pozzetti asciutti più del tempo necessario per dispensare il reagente del passaggio successivo,
- dopo l'ultimo passaggio di lavaggio la piastra deve essere asciugata su un foglio di carta assorbente.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di siero o plasma di cane.

Preparare una diluizione **1:100** di ciascun campione con il diluente.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio

Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 9 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 100 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 900 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 100 µl del controllo positivo e 100 µl del controllo negativo in due pozzetti successivi. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl dei campioni diluiti.
Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente.
3. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
4. Aggiungere 100 µl di coniugato in ogni pozzetto. Agitare delicatamente in modo da miscelare uniformemente la soluzione nei pozzetti.
Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente.
5. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
6. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di substrato.
Coprire ed incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente.
7. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop.
8. Misurare il valore di assorbanza di ogni pozzetto con un lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Se i campioni sono stati condotti in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica dei 2 pozzetti.

Validazione del test

Il test è considerato valido se:

Controllo positivo: OD > 1

Controllo negativo: OD < 0,2

Determinazione del valore di CUT-OFF

Cut-off = OD controllo positivo x 0,2

Interpretazione dei risultati

Campioni Positivi: campioni con OD maggiore del valore di cut-off.

Campioni Negativi: campioni con OD minore del valore di cut-off.

TITOLAZIONE

Basso titolo (corrispondono a valori in IFA di 1:20-1:40): campioni con un valore di OD compreso nel range 0,2 x OD controllo positivo e 0,4 x OD controllo positivo.

Medio titolo (corrispondono a valori in IFA di 1:80-1:160): campioni con un valore di OD compreso nel range 0,4 x OD controllo positivo e 0,8 x OD controllo positivo.

Alto titolo (corrispondono a valori in IFA \geq 1:320): campioni con un valore di OD maggiori di 0,8 x OD controllo positivo.

DISTEMPER IgG Ab ELISA

Kit ELISA for the detection of IgG antibodies anti-Canine Distemper virus in canine serum or plasma samples

TEST PRINCIPLE

This test is performed as an indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA). The antigen of Canine Distemper Virus (CDV) is fixed on the wells of the plate. The samples to be analyzed are distributed in each well. If the sample contains specific antibodies anti-CDV, these antibodies will bind to the antigen adsorbed, forming the Ag-Ab complex. After washing to eliminate all non-fixed material, the presence of anti-CDV antibodies is detected by a specific anti-canine IgG monoclonal antibody, labelled with horseradish peroxidase (conjugate). All non-fixed material is removed by a second washing. A specific enzyme substrate is then added to the wells which causes a colorimetric reaction when the conjugate is present.

TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control - ready for use;
- 1 dropper of negative control - ready for use;
- 1 dropper of conjugate - ready for use;
- 1 bottle of washing solution - 10X;
- 1 bottle of diluent - ready for use;
- 1 dropper of substrate (TMB) - ready for use;
- 1 dropper of stop solution - ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Test tubes for sample dilutions; precision pipettes and tips; spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

PRECAUTIONS

1. Read the instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (+20-25°C) prior to use.
3. Do not substitute or mix instructions or reagents from different kits or lots.
4. The substrate is very sensitive to the light and to contaminations. Do not use the tip directly in the vial. The stop solution is a diluted strong acid. Handle the two reagents with care.
5. Do not use components after expiry date.
6. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled.
7. In each utilization of the kit the positive and negative controls must be tested.
8. Use a new tip for each sample.
9. Observe each incubation time.
10. Prepare each sample according to instructions.
11. Avoid any contamination of the reagents.
12. All kit components must be stored at +2-8°C.

WASHING STEPS

The washing steps may be carried out using an automated plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well. After the incubation, the washing steps should be carried out according to the following instructions:

- throw out the content of the plate by vigorously turning the plate over to avoid the possible mixture of the content from one well to another,
- dispense a volume of 300 µl of wash buffer into each well,
- shake the plate gently, avoiding contamination between wells,
- turn over the plate and tap the wells vigorously to remove the wash buffer,
- repeat the process as many times as is indicated by the kit's instructions,
- prior to emptying out the plate's contents during the final washing step, ensure that the next reagent to be added to the plate is ready to use,
- the wells should not be left dry for any longer than strictly necessary in order to dispense the reagent of the following step,
- after the last washing step, blot the empty wells face down on clean paper towels or absorbent paper to remove residual wash buffer.

PREPARATION OF SAMPLES

Canine serum or plasma samples.

Prepare a **1:100** dilution of each sample to be tested using diluent.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer solution:

Dilute one part of the wash buffer supplied into 9 parts of distilled or deionized water (ie. 100 ml of concentrated wash buffer with 900 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution may be stored at +2-8°C.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive and negative controls in two different wells.
Add 100 µl of diluted samples on the remainder wells of the plate.
Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Delicately shake the plate to obtain a correct homogenization of the reagents.
Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.
5. Repeat the wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
6. Add 100 µl of substrate to each well.
Seal the plate and incubate at room temperature for 5 minutes.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Measure the absorbance value of each well with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 450 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD value for the samples and controls will be the mean of both wells.

Test Validation:

The test is to be considered valid when:

Positive Control: $OD > 1$

Negative Control: $OD < 0.2$

CUT-OFF value determination:

Cut-off = OD positive control x 0.2

INTERPRETATION OF THE RESULTS

Positive samples: samples with an OD higher than the cut-off value.

Negative samples: samples with an OD lower than the cut-off value.

TITRATION:

Low titers (corresponding to IFA values of 1:20-1:40): samples with OD values ranging from 0.2 x OD positive control to 0.4 x OD positive control.

Medium titers (corresponding to IFA values of 1:80-1:160): samples with OD values ranging from 0.4 x OD positive control to 0.8 x OD positive control.

High titers (corresponding to IFA values $\geq 1:320$): samples with OD values higher than 0.8xOD positive control.



AGROLABO

Manufactured by;

Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories

and Production Centre

Diagnostic Division

Via Masero 59

10100 Scarmagno (TO)

Italy

Tel +39 0125 731111

Fax +39 0125 731190

E-mail agrolabo@agrolabo.it

www.agrolabo.it

shop.agrolabo.it