



AGROLABO

Ehrlichia Ab ELISA 96 wells

Ehrlichia Ab ELISA 96 wells

Kit ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-Ehrlichia canis in campioni di siero o plasma di cane

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA indiretta.

L'antigene di Ehrlichia canis è adeso ai pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare. Se il campione in esame contiene specifici anticorpi anti-Ehrlichia, questi si legheranno all'antigene adeso formando il complesso Ag-Ab.

Dopo una serie di lavaggi, al fine di eliminare tutto il materiale non legato, gli anticorpi anti-Ehrlichia presenti nel campione verranno evidenziati da un anticorpo monoclonale specifico anti-IgG canine, marcato con perossidasi di rafano. Dopo un secondo lavaggio per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato che si legherà esclusivamente al coniugato, sviluppando una reazione colorimetrica.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso;
- 1 flacone di siero cut-off - pronto all'uso;
- 1 flacone di coniugato - 100X;
- 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 il siero cut-off.
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.

Coniugato

Deve essere preparato immediatamente prima dell'uso. Diluire la quantità richiesta di coniugato con il diluente (**1:100**). Mescolare la soluzione prima dell'uso. Preparare solo la quantità necessaria e non riutilizzare la quantità avanzata.

PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 100 µl di controllo positivo e 100 µl di siero cut-off 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. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato diluito. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogeneizzazione dei reagenti.
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 stop.
8. Misurare il valore di assorbanza di ogni pozzetto (OD) con un lettore di piastra 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

Siero di Cut-off: OD > 0,4

Il siero cut-off serve per discriminare i campioni positivi dai negativi.

Dividendo il valore di OD dei campioni con il valore di OD del siero cut-off si ottiene un valore detto Indice di Positività (IP).

$$IP = OD \text{ campione} / OD \text{ cut-off}$$

L'indice IP è proporzionale al livello di anticorpi presenti nel campione.

Il valore di IP del controllo positivo deve essere > 2.

Interpretazione dei risultati

Campioni Positivi:

sono da considerare positivi i campioni con indice di positività superiore a 1,1.

Campioni Negativi:

sono da considerare negativi i campioni con indice di positività inferiore a 0,9.

Campioni Dubbi:

sono da considerare dubbi i campioni con indice di positività compreso tra 0,9 e 1,1.

Ehrlichia Ab ELISA 96 wells

Kit ELISA for the detection of specific antibodies to Ehrlichia canis in canine serum or plasma samples

TEST PRINCIPLE

The test is performed as an indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA). The antigen of Ehrlichia canis is fixed on the wells of the plate. The samples to be analyzed are distributed in each well. If the sample contains specific antibodies against Ehrlichia, 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-Ehrlichia 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 specific antibodies are present.

TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control - ready for use;
- 1 dropper of cut-off serum - ready for use;
- 1 dropper of conjugate - 100X;
- 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 control and the cut-off serum 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.

Conjugate:

To be prepared immediately prior to use. Dilute the required amount of conjugate **1:100** with the diluent. Mix the solution prior to use. Prepare only the required amount and do not reuse surplus conjugate.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive control and 100 µl of cut-off serum in two different wells. Add 100 µl of the 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. Dispense 100 µl of previously prepared conjugate into 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 sample or controls will be the mean of both wells.

Test Validation:

The test is to be considered valid when:

Positive Control: OD > 1

Cut-off serum: OD > 0.40

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

$$IP = OD \text{ sample} / OD \text{ cut-off}$$

The value of IP is proportional to the level of antibodies present in the sample. The IP of the positive control must be > 2.

Interpretation of the results

Positive Samples: samples with IP value higher than 1.1.

Negative Samples: samples with IP value lower than 0.9.

Doubtful Samples: samples with IP value from 0.9 to 1.1.



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