

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



## INGEZIM FeLV DAS

Prod Ref: 16.FLV.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo, para la detección del virus de la Leucemia Felina en suero o plasma de gato

Doble antibody immunoenzymatic assay for Feline Leukaemia Virus antigen detection in cat sera or plasma samples.

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 dividida en 12 tiras de 8 pocillos antigenada con anticuerpo monoclonal específico del FeLV 1 coated plate divided in 12 strips of 8 wells each	1	-
Vial Suero Control Positivo listo para su uso Vial of Positive Control serum ready to use	1	2 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials of Negative Control serum ready to use	1	2 ml
Vial Conjugado específico (anti FeLV-Peroxidasa) listo para su uso Vials Conjugate (anti FeLV Peroxidase) ready to use	1	12 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	15 ml
Frascos solución de frenado (Ac. 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 de doble anticuerpo cuyo fundamento se detalla a continuación:

Las placas se suministran tapizadas con un anticuerpo monoclonal específico frente al virus de la Leucemia Felina. Cuando sobre las placas se dispensan las muestras de suero, en el caso de que estas contengan partículas

virales, éstas serán capturadas por el anticuerpo monoclonal de la placa.

Si después se añade otro AcM conjugado, antígeno de la leucemia Felina marcado con peroxidasa, éste se unirá al antígeno y tras eliminar el material no adherido, podrá revelarse la presencia o no del conjugado mediante la adición de un sustrato adecuado.

## 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 DEL KIT

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 pocillos.
- 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.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.

## INGEZIM FeLV DAS 16.FLV.K2

- 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:

No precisan de diluciones previas. Directamente añadir 50 µl de cada muestra por pocillo.

### 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.

### VII. PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar todos los reactivos del kit a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
2. Añadir **50 µl** de los sueros problema y de los controles positivo y negativo (cada suero y cada control en un pocillo diferente). Seguidamente, añadir **50 µl** de conjugado a todos los pocillos, en el mismo orden en que se adicionaron los sueros y controles. Agitar suavemente, con ayuda del marco unos 30 segundos. Tras ésto, tapar e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
3. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
4. 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 agilizar el proceso.
5. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.
6. 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 + 0,20**

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

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 volver a valorar al animal. A intervalos mensuales por 3 meses para determinar si existe o no infección..

## I. TECHNICAL BASIS

---

The kit is based on a **Double antibody sandwich enzymatic immunoassay**. This technique shows big advantages from the rest of the techniques used till now: more sensitivity, more specificity, faster to do and easily automatizable.

Here we describe the technical basis of the assay: a specific monoclonal antibody (Mab) against FeLV is coated on a solid support (polystyrene plate). When a sample containing viral antigen is added, the viral particles will be caught by the Mab. After we add a second specific Mab to FeLV.

This is a conjugate Mab (Mab-peroxidase). After incubation we could demonstrate the presence of this conjugate Mab by adding a chromogenic substrate that in presence of the enzyme will produce a colorimetric reaction.

The use of these very specific and stables Mabs, warrants the objectivity, specificity, safety and accuracy of the assay.

The coating Mab as well as the conjugate Mab, are very specific Mabs that allows the specific detection of FeLV antigen.

## 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 o f 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 is very sensitive to light an contamination. Do not introduce pipettes into the bottle.Pour off the volume extrictly needed.

## III. STORAGE

---

**Storage:** 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 multichanel 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:

It is not necessary any previous dilution. Add directly 50 µl of the samples to each well.

## 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. Take out the plate (or strips to be used) and keep it least 60 min. at room temperature before starting the test.
2. Add **50 µl** of positive control, and **50 µl** of the negative control in duplicate wells (prepared as specified before). Add **50 µl** of each sample to test on each remainder wells. We recommend running the samples in duplicate wells. Add **50 µl** of conjugate to each well (Controls and samples).
3. Wash 4 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature**.
5. Add 100 µl of stop solution to each well.
6. 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 INTERPRETATION OF THE RESULTS:

The reading must be done with an ELISA reader at **450 nm**.

### Kit Validation:

The test could be validated when:

- O.D of positive control >1.**
- O.D of negative control <0,20.**

### Results Interpretation:

Taking the negative control value, will be determined the following cut off:

- Negative cut off: O.D of negative control + 0,20**
- Positive cut off: O.D of negative control + 0,25**

### Positive samples:

Samples with an OD higher than the positive Cut Off value.

### Negative samples:

Samples with a OD lower than the negative Cut Off value.

### 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 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.

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](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)



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