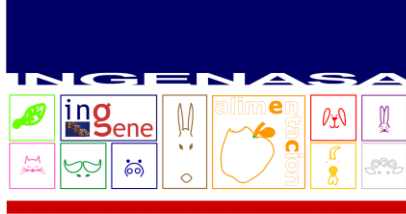


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM CORONA DIFERENCIAL 2.0

Prod Ref: 11.DIF.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo, para la detección y diferenciación de anticuerpos específicos frente a los coronavirus porcino, TGEV y PRCV, en muestras de suero

Blocking immunoenzymatic assay for the specific detection and differentiation of antibodies to transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus in pig serum.

Última revisión / Last review: 23-5-13
REGISTRADO POR EL MAGRAMA: Nº 1813 RD

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo para PRCV Vials with Positive Control Serum to PRCV inactivated	1	0.6 ml	2	0.6 ml
Viales de suero Control Positivo para TGEV Vials with Positive Control Serum to TGEV inactivated	1	0.6 ml	2	0.6 ml
Viales de suero Control Negativo para coronavirus porcino Vials negative control serum to Porcine Coronavirus	1	1.2 ml	2	1.2 ml
Viales de Conjugado A (TGEV+PRCV). Listo para su uso. Vials with Conjugate A (TGEV+ PRCV). Ready to use		30 ml	1	30 ml
Viales de Conjugado B (TGEV). Listo para su uso. Vials with Conjugate B (TGEV). Ready to use	1	30 ml	1	30 ml
Fascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Fascos con Diluyente (DE17-01). Listo para su uso Bottles with Diluent (DE17-01). Ready to use.	1	15 ml	2	15 ml
Fascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate.	1	30 ml	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	65 ml	1	65 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Agua destilada o desionizada
Micropipetas de 5 a 200 µl.
Puntas de micropipeta de un solo uso
Dispositivos para lavado de placas.
Probetas de 50-250ml
Lector ELISA (filtro de 450 nm)

Distilled or deionised water.
Micropipets from 5 to 200 µl.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 ml
ELISA Reader (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de competición (**ELISA de bloqueo**).

Sobre un soporte sólido (una placa de poliestireno), se fija el **antígeno viral recombinante** capturado por un anticuerpo monoclonal específico. Cada muestra de suero a ensayar, se dispensa en dos pocillos antigenados. En el caso de contener anticuerpos frente a PRCV, éstos se unirán (en los dos pocillos) a los epítomos comunes a los dos virus, quedando sin "ocupar" el epítomo exclusivo del TGEV. Si el suero problema contiene anticuerpos específicos frente a TGEV, estos "ocuparán" todos los epítomos del antígeno presente en ambos pocillos. Y finalmente, si no contiene anticuerpos frente a ninguno de los dos virus, no "ocupará" ninguno de los epítomos.

Para poder revelar las reacciones acontecidas en los pocillos, se utilizan dos conjugados diferentes: uno es un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para los epítomos comunes a los dos virus, y el otro es también un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa, pero específico para el

epítomo exclusivo del TGEV. Cada uno de los conjugados se añade a uno de los pocillos ensayados, y "ocuparán" los epítomos que hayan quedado libres tras la incubación con el suero problema. Después de eliminar mediante lavados todo resto de material no adherido, y añadiendo a cada pocillo el sustrato adecuado a la peroxidasa, se observará la aparición de una reacción coloreada allí donde los conjugados hayan encontrado epítomos específicos sin ocupar por los anticuerpos del suero problema.

Interpretando las diferentes combinaciones de los resultados de los dos pocillos, podremos determinar:

- ❖ La ausencia de anticuerpos frente a cualquiera de los dos virus : Color en ambos pocillos.
- ❖ La presencia de anticuerpos frente a TGEV: Ausencia de color en ambos pocillos.
- ❖ La presencia de anticuerpos únicamente frente a PRCV : Ausencia de color en pocillo de conjugado para PRCV/TGEV y color en pocillo de conjugado para TGEV.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
9. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Es necesario, por tanto, retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y NUNCA devolver al frasco el sustrato sobrante.
10. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución (se trata de un ácido).

III. CONSERVACION DEL KIT

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.

Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

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 volcandola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa ya que si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infectivos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el 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:

Los sueros problemas se utilizarán a la dilución $\frac{1}{2}$. **¡ATENCIÓN!** se ha de tener en cuenta que cada suero se probará en dos pocillos.

Las diluciones de los sueros, pueden realizarse directamente en la placa, añadiendo a cada pocillo 50 μ l de diluyente y 50 μ l de suero

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

♦ **Solución de lavado :**

Diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado +960 ml de H₂O). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

♦ **Preparación de Controles (+) y (-) :**

Los sueros controles se ensayaron a la dilución $\frac{1}{2}$ en diluyente de sueros.

Es conveniente distribuir los controles en alícuotas y mantenerlos en congelación cuando no vayan a utilizarse inmediatamente.

La dilución de los controles puede realizarse directamente en la placa añadiendo a cada pocillo correspondiente 50 μ l de suero y 50 μ l de diluyente

♦ **Preparación de los conjugados A y B:**
Los conjugados se suministran listos para su uso.
NO DILUIR.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Dispensar 50 μ l de diluyente a cada pocillo y 50 μ l de los sueros controles y de las muestras según las siguientes indicaciones:
 - 2 pocillos para suero control Positivo para PRCV
 - 2 pocillos para suero control Positivo para TGEV
 - 4 pocillos para suero control Negativo
 - 2 pocillos para cada una de las muestras a analizar.
3. Tapar la placa e **incubar durante 1 h a 37°C.**
4. Lavar la placa 3 veces según procedimiento descrito
5. Añadir 100 μ l de conjugado A en los primeros pocillos de cada control y cada muestra y otros 100 μ l de conjugado B en los duplicados de cada control y cada muestra.
6. Sellar la placa e **incubar 30 minutos 37°C.**
7. Lavar la placa 6 veces según procedimiento descrito.
8. Añadir 100 μ l de sustrato, a cada uno de los pocillos. Mantener la reacción **durante 10 minutos a temperatura ambiente** y en oscuridad.
9. Añadir 100 μ l de solución de frenado a cada uno de los pocillos.
10. Leer 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 RESULTADOS:

A. VALIDACION DEL TEST:

El test se considerará válido cuando se cumplan los siguientes resultados:

1.- **Valores de DO del Control (+) para TGEV:**

Pocillo con Conjugado A < 0.3
Pocillo con Conjugado B < 0.3

2.- **Valores de DO del Control (+) para PRCV:**

Pocillo con Conjugado A < 0.3
Pocillo con Conjugado B > 0.7

3.- **Valores de DO del control negativo:**

Pocillos con Conjugado A >1.00
Pocillos con Conjugado B >1.00

B.- **CALCULO DE PUNTOS DE CORTE:**

1. Punto de corte Positivo/Negativo para Coronavirus Porcino:
2. **CUT OFF (1)** = 60% DO (control (-)) en los pocillos de Conj A.
3. Punto de corte Positivo para TGEV:
CUT OFF (2) = 60% DO (control (+) PRCV) en los pocillos de Conj B.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an enzymatic immunoassay (Blocking ELISA). We make a brief description of the technique below:

The **TGEV recombinant antigen** is captured on the plate through a monoclonal antibody previously fixed on the wells). Each serum sample to assay, needs to be settle in two wells. After incubation we add to one of the wells a specific monoclonal antibody (conjugate A) against one common epitope of both corona viruses. If the serum sample contains antibodies against any one of the viruses, they will not permit the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the Mab will bind to the antigen on the plate.

In the other well we will add a specific Mab (conjugate B) against one specific

epitope of the TGEV. If the serum sample contains antibodies against this virus (TGEV) the Mab will be competed by these antibodies and it will not bind to the antigen. If serum sample does not contain antibodies against TGEV the Mab will bind to the antigen.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled Mabs by adding the substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

The different combinations of results in both wells will permit us to know if the serum sample contains antibodies against TGEV, or against PRCoV or do not contain antibodies against any of them.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking or smoking where specimens or Kit reagents are being handle
7. Do not pipette by mouth .Use a new tip for each serum sample.
8. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.
9. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
10. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Between +2°C and +8°C.

Once opened, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°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 SAMPLE

The sera sample needs to be at 1/2 dilution in diluent to be tested.

¡ATTENTION! Take in consideration that sera samples need to be tested in two wells.

For your facility the dilution of sera samples could be done directly on the wells by adding 50 µl of serum and 50 µl of sera diluent to each well.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

❖ Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water (i.e. 40 ml of concentrate plus 960 ml of dH₂O). When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

❖ Preparation of the control sera:

If you are going to run the kit in a partial way, we recommend distributing the control sera in aliquots and storing it at -20°C till use.

Control sera needs to be assayed at a ½ dilution with serum diluent. This dilution could be done directly on each well of the plate in which the sera will be assayed by adding 50 µl of serum and 50 µl of serum diluent.

**Preparation of the conjugates A and B:
Conjugates are supplied ready to use.
DO NOT DILUTE.**

Desarrollado y fabricado en España por:
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

Distributed in by:

