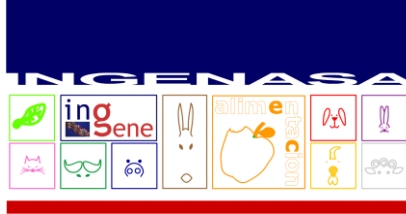


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM CORONAVIRUS PORCINO 2.0

Prod Ref: 11.PRC.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo, para la detección de anticuerpos específicos frente a *coronavirus porcinos (TGEV/PRCV)* en muestras de suero.

Blocking immunoenzymatic assay for antibody detection to Porcine Coronaviruses. This assay does not allow the differentiation of antibodies to PRCV from the TGEV ones.

Última revisión / Last revision: 23-05-13

INGEZIM CORONAVIRUS PORCINO
11.PRC.K3

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 Vials positive control serum	1	0,6 ml	2	0,6 ml
Viales de suero Control Negativo Vials negative control serum	1	1,2 ml	1	1,2 ml
Viales de Conjugado A (TGEV+PRCV) listo para su uso Vials with peroxidasa conjugate A (TGEV + PRCV) ready to use	1	30 ml	2	30 ml
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente listo para usar (DE17-01) Bottles with diluent ready to use (DE17-01)	1	15 ml	2	15 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 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 bloqueo (ELISA de bloqueo), que se describe brevemente a continuación:

Las placas se suministran tapizadas de proteínas virales recombinantes de Coronavirus porcino, capturada por un anticuerpo monoclonal específico. Sobre los pocillos así antigenados, se dispensan tanto los sueros a ensayar como el conjugado específico del ensayo. Este conjugado es un anticuerpo monoclonal específico de Coronavirus porcino, marcado con peroxidasa. Cuando el suero problema, contiene anticuerpos frente al Coronavirus porcino, estos se unirán al antígeno presente en el pocillo, impidiendo la unión al mismo del

conjugado. Por el contrario, cuando el suero problema no contenga anticuerpos frente a Coronavirus porcino, el conjugado podrá unirse de forma específica al antígeno presente en el pocillo. Tras lavar la placa eliminando el material no adherido, se añade el sustrato (TMB). Este reactivo en presencia del enzima peroxidasa, producirá una reacción colorimétrica medible a 450 nm. De este modo, cuando la muestra no contenga anticuerpos frente a Coronavirus porcino, se desarrollará una reacción colorimétrica indicando que el conjugado ha podido unirse al antígeno y viceversa, cuando no aparezca color tras este paso del ensayo, nos indicará que el suero contenía anticuerpos y que por lo tanto ha bloqueado la unión del conjugado.

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. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

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 volcándola 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.

INGEZIM CORONAVIRUS PORCINO

11.PRC.K3

- 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. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se analizan a dilución $\frac{1}{2}$ en diluyente. La dilución de las muestras puede realizarse directamente en los pocillos añadiendo 50 μ l de diluyente y 50 μ l de suero en cada pocillo.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

• **Solución de lavado:**

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes 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.

• **Sueros Control (+) y (-):**

Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir para su ensayo deberá realizarse la dilución $\frac{1}{2}$ en el diluyente suministrado. Esta dilución puede

realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 μ l de diluyente y 50 μ l de suero.

Los sueros controles, permanecerán estables durante periodos cortos, si se requiere alargar estos periodos, recomendamos distribuirlos en alícuotas y almacenarlos hasta su uso a -20°C.

• **Preparación del conjugado A**

El conjugado se suministra listo para su uso. NO DILUIR

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Contando con incluir dos pocillos para cada uno de los sueros control y uno o dos pocillos por cada muestra problema, dispensar en cada pocillo de la placa a utilizar el volumen de 50 μ l de diluyente suministrado. Dispensar en los pocillos reservados para los sueros controles 50 μ l de suero y en el resto de los pocillo 50 μ l de cada una de las muestras. De este modo obtendremos una dilución de los sueros $\frac{1}{2}$. Sellar la placa e **incubar 1 hora a 37°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 μ l de conjugado a cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 30 minutos 37°C**.
5. Lavar 4 veces según procedimiento descrito.
6. Añadir 100 μ l de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante **10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad**.
7. Añadir 100 μ l de solución de frenado a cada pocillo.
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

A. VALIDACION DEL TEST

El ensayo se considerará válido siempre que se cumpla los siguientes resultados:

DO (Control +) < 0,300

DO (Control -) > 1,000

B. INTERPRETACION DE RESULTADOS:

- **Cálculo del punto de corte:**

El punto de corte (CUT OFF), se calcula

como el 60% del valor de densidad óptica del control negativo:

$$\text{CUT OFF} = 0.6 \times \text{DO control -}$$

- **Interpretación:**

Los sueros cuyo valor de DO, sea superior al punto de corte, se consideraran negativos y los que presenten valores de DO inferior serán considerados positivos.

I. TECHNICAL BASIS

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

The antigen, a recombinant viral protein is fixed in a solid support (polystyrene plate) by a specific monoclonal antibody. After incubation with serum sample we add a monoclonal antibody (peroxidase conjugated) against one common epitope of both TGE and PRCV 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.

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

When the well gives the colorimetric reaction that means that the conjugated Mab has bound to the antigen and for this reason the sample could be marked as negative to Porcine Coronavirus. In the other hand when the well does not give this colorimetric reaction it means that the sample antibodies has bound to the antigen without permitting the binding of the conjugated Mab. In this case the sample must be marked as Positive to Porcine Coronavirus (TGEV and/or PRCV).

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. Do not eat, drink, or smoke where specimens or Kit reagents are being handled.
7. Do not pipette by mouth. Use a new tip for each serum sample.
8. Substrate must be handled with care, it is very sensitive 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

All reagents and components must be stored 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 samples need to be at 1/2 dilution in diluent to be tested.
For your facility the dilution of sera samples could be done directly on the wells by adding 50 µl of diluent and 50 µl of serum 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 (+) and (-):**
If the kit is going to be used partially, we recommend distributing control sera in aliquots and storing it a -20°C till use.
- Control sera must be assayed at a 1/2 dilution with 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 reconstituted serum and 50 µl of diluent.
- Preparation of the conjugates A**
Conjugates are supplied ready to use.
DO NOT DILUTE

VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 50 µl of diluent to each well and 50 µl of Positive control serum, Negative control serum and samples to their respective wells. We recommend running samples and control in duplicate. Incubate the plate **1-hour at 37°C.**
- Wash 3 times.
- Add 100 µl of conjugate to each well.
Incubate the plate for **30 min at 37°C.**
- Wash 4 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**, in a dark place.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

A. Validation of the test:

The test could be considered valid if:

The ODs for the Positive Control < 0.3

The ODs for the Negative Control > 1.00

B. Interpretation of the results:

- Cut Off calculation:**

Positive/Negative
Cut Off value = 0.6 x OD of Neg. Control

- Results Interpretation:**

When you are running duplicate samples, OD values will be calculate for each sample as the arithmetic mean of both values.

⇒ All samples with OD higher than CUT OFF value must be considered negative.

- All samples with OD values lower than CUT OFF values must be considered positive

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)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



Distributed in _____ by: