

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM TGEV 2.0

Prod Ref: 11.TGE.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo,
para la detección de anticuerpos
específicos frente a TGEV en muestras
de suero

Blocking immunoenzymatic assay for
the specific detection of antibodies to
transmissible Gastroenteritis Virus in
porcine serum

Última revisión / Last review: 23-05-13

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 Conjugado B (TGEV). Listo para su uso. Vials with Conjugate B (TGEV). Ready to use	1	30 ml	2	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 μ l.
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 μ l.
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 los pocillos antigenados. En el caso de contener anticuerpos frente a TGEV, éstos se unirán al antígeno de la placa "ocupando" los determinantes antigénicos específicos: Por el contrario si no contiene anticuerpos frente a TGEV los determinantes antigénicos específicos, permanecerán "libres".

Para poder revelar las reacciones acontecidas en los pocillos, se utiliza un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para los epítomos de TGEV.

Este conjugado se añade a cada uno de los pocillos ensayados y "ocuparán" los determinantes antigénicos que hayan quedado libres tras la incubación con el suero problema. Después de eliminar mediante lavados el 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. De este modo los sueros negativos presentarán reacción coloreada en el pocillo ensayado y los sueros positivos no presentarán esta reacción.

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 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 TGEV

11.TGE.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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Los sueros problemas se utilizarán a la dilución 1/2.

Las diluciones de los sueros, pueden realizarse directamente en la placa, añadiendo a cada pocillo 50 µl de diluyente y 50 µl 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 ensayaran a la dilución 1/2 en diluyente de sueros. Una vez abiertos, 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 µl de diluyente y 50 µl de suero
- **Preparación del conjugado**
El conjugado se encuentra listo para su uso.
NO DILUIR.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Dispensar 50µl de diluyente a cada pocillo y 50µl de los sueros controles y de las muestras a cada pocillo. Es recomendable la realización e duplicados, tanto para los controles, como para las muestras.
3. Tapar la placa e **incubar durante 1 h a 37°C.**
4. Lavar la placa 3 veces según procedimiento descrito
5. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo
Sellar la placa e **incubar 30 minutos 37°C.**
6. Lavar la placa 6 veces según procedimiento descrito.
7. Añadir 100 µl de sustrato, a cada uno de los pocillos. Mantener la reacción **durante 10 minutos a temperatura ambiente** y en oscuridad.
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada uno de los pocillos.
9. Leer a 450 nm en 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:

- *Absorbancia del Control para TGEV < 0.3*
- *Absorbancia del Control para PRCV > 0.7*

B.- CALCULO DE PUNTOS DE CORTE:

CUT OFF POSITIVO = 60% del valor de Abs del control PRCV

CUT OFF NEGATIVO = 70% del valor de Abs del Control PRCV.

C.-INTERPRETACION DE RESULTADOS:

- Los sueros que presentan una absorbancia superior al punto de corte negativo, se consideraran negativos
- Los que presenten una absorbancia inferior al punto de corte positivo, serán considerados positivos.
- Los sueros con absorbancias entre estos 2 valores se consideran dudosos y se recomienda repetir el ensayo con otra muestra de suero.

I. TECHNICAL BASIS

The Kit has been designed to detect, in a very easy way, specific antibodies to TGEV in porcine serum samples. This Kit is based on a blocking enzymatic immunoassay. 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. The serum sample is added to each well. After incubation, we add a specific **monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to S protein of the TGEV**. If the serum sample does not contain antibodies against the

virus, the conjugate will bind to the plate, whereas if it contains specific antibodies to TGEV, these antibodies will bind the antigen on the plate blocking the binding of the conjugate.

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

Due to the high specificity of the monoclonal used as conjugate, the assay has a high specificity and sensitivity index.

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 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

All reagents and components must be stored between +2°C y +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.

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:**

Once opened, control sera are stable for one month. 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 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 serum and 50 µl of diluent

- **Preparation of the conjugate:**

Conjugate is provided ready to use.
DO NOT DILUTE

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 50 µl of diluent to each well.
3. Add 50 µl of PRCV control serum, TGEV control serum and samples to each well of the plate. We recommend running samples and control in duplicate. **Incubate the plate for one hour at 37°C.**
4. Wash 3 times following described procedure
5. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate **and incubate for 30 minutes at 37°C**
4. Wash 6 times following described procedure.
5. Add 100 µl of substrate, prepared following previous instruction, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature.**
6. Add 100 µl of stop solution to each well.
7. 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 TGEV Control Serum < 0.3
- The ODs for the PRCV Control Serum > 0.7

B) Interpretation of the results:

A. Cut Off calculation:

Cut Off (+) = 0.6 × OD of PRCV Control

Cut Off (-) = 0.7 × OD of PRCV Control

B. Results Interpretation:

When duplicate samples are being run, OD values of each sample must be calculated as the arithmetic mean of both values.

Every sample with OD higher than CUT OFF (-) value must be considered as **Negative** to TGEV antibodies.

Every sample with OD value lower that CUT OFF (+) value will be considered as **Positive** to TGEV antibodies.

Samples with OD between these two values should be considered doubtful and retested.

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:

