



INGEZIM CORONA FELINO

Prod Ref: 16.FCV.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto, para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente a coronavirus felino, en suero de gato.

Enzyme immunoassay for detection and / or quantification of antibodies specific for feline coronavirus in cat serum

Ultima revision / Last revision: 20-05-08

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa divididas en tiras de 8 pocillos que permiten la utilización parcial del kit tapizada con antígeno de Coronavirus Felino Feline Coronavirus antigen-coated plate	1	-
Vial Suero Control Positivo listo para su uso Vial of Positive Control serum ready to use	1	3,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials of Negative Control serum ready to use	1	3,5 ml
Vial Conjugado (anti-IgG de gato-Peroxidasa) concentrado 100 x Vials with Peroxidase Conjugate 100 x (concentrated)	1	350 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frascos de Diluyente de suero y conjugado a la dilución de uso (DE01-01) Bottles with serum diluent and conjugate ready to use (DE01-01)	1	125 ml
Bote de sustrato (TMB) Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	15 ml
Frascos solución de frenado a la dilución de uso (Ac.Sulfúrico) Bottle containing stop solution (Sulphuric acid)	1	15 ml

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto cuyo fundamento se detalla a continuación.

En caso de infección por coronavirus la respuesta inmune del animal dará lugar a los anticuerpos específicos, que son a la postre los detectados en el ensayo.

Las placas se suministran tapizadas con antígeno viral inactivado (concretamente con el virus de la peritonitis infecciosa o FIPV).

En cada pocillo se dispensan los sueros problemas a valorar. Cuando estos

contengan anticuerpos frente al virus, se unirán al antígeno de la placa y tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de los mismos mediante la adición de un conjugado antiespecie marcado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos específicos presentarán una reacción coloreada. Mientras que en los pocillos donde se hayan ensayado sueros negativos, no aparecerá reacción coloreada.

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

Normas para la conservación 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 pocillo.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.

INGEZIM CORONA FELINO 16.FCV.K1

- 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.
- 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:

Para el ensayo de los sueros, se realiza la dilución 1/200 de los mismos (**Por ej.:** 5µl de suero en 1 ml de diluyente). Para titular se realizan las diluciones en base 2 a partir de ésta (1/400, 1/800, 1/1600 etc)

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Diluir 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.
- **Preparación del conjugado:**
Diluir a la 1/100 en el diluyente. Diluir únicamente la cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.
- **Preparación de Controles (+) y (-):**
Los controles se presentan a la dilución de uso.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Llevar todos los reactivos del kit a temperatura ambiente, antes de iniciar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de cada muestra por pocillo, preparada según indicaciones previas. Añadir 100 µl de los controles. (se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles). Cubrir e **incubar 30 minutos a temperatura ambiente.**
3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.
4. Añadir 100 µl de Conjugado (antiespecie-Peroxidasa) a cada pocillo, preparado según indicaciones previas.
Tapar la placa e **incubar 15 minutos a temperatura ambiente.**
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. 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.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.
8. 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 los controles se tomará la media aritmética del duplicado.

Validación del kit:

- ⇒ **Abs_{450nm} control positivo = 0.9 ± 0.3**
- ⇒ **Abs_{450nm} control negativo $\leq 0,20$.**

Interpretación de los resultados:

Con respecto al valor del control negativo, se determinará punto de corte:

$$\text{Punto de corte} = \text{Abs control negativo} \times 4$$

Se considerarán:

- ⇒ **Valores de Abs inferiores al punto de corte** corresponderán a muestras negativas.
- ⇒ **Valores por encima del punto de corte se corresponden con** muestras positivas. De estas muestras será de gran utilidad conocer su título que será la última dilución cuya Abs₄₅₀ esté por encima del cut off positivo.

Estadísticamente el 75% de los gatos afectados de peritonitis infecciosa tienen títulos iguales o superiores a 1/6400 (el 50% tienen títulos >1/12800) mientras que sólo el 20% de los gatos afectados por el coronavirus entérico presentan títulos tan elevados, es decir mayores o igual a 1/6400 (sólo el 5% tienen títulos 1/12800 ó superiores).

I. TECHNICAL BASIS

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

We fix the antigen on a polystyrene plate. When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera sample, we can detect the presence of cat antibodies using a specific peroxidase conjugate.

After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which could be measured by a spectrophotometer.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies against the virus in the cat sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies.

The aim of this kit is provide to the users with a reliable and plain diagnostic technique for this disease.

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. **IMPORTANT!**
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 of 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 must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

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 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 SAMPLES:

Samples must be cat sera. Make a 1/200 dilution (5 µl of serum in 1 ml of diluent). Add 200 µl of this dilution on the first well of a row and then make two-fold dilutions by passing 100 µl to the next wells (previously filled with 100 µl of diluent).

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 9 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable at +4°C.
- **Control sera:**
Controls are ready to use.
- **Preparation of the conjugate: to make immediately before use.**
Dilute the needed quantity of conjugate provided in the kit 1/100 into the supplied diluent (e.g. 10 µl of conjugate into 990 µl of diluent is enough quantity for one strip).

Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected..

VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add samples diluted as previously described to each well to be used. Add positive and negative controls to the wells reserved for them. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at room temperature** (20 - 25°C).
3. Wash 4 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the 8. previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate for 15 **minutes at room temperature** (20-25°C).
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution to each well. Keep the plate for **5 minutes at room temperature**.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.

Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Kit Validation:

The test is validated when:

OD (Negative Control): ≤ 0.20
OD (Positive Control)= 0.9 ± 0.3

Results Interpretation:

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

Cut off:

OD of Negative Control x 4

Coronavirus-Positive samples:

Samples with an OD higher than the Cut Off value.

Coronavirus-Negative samples:

Samples with an OD lower than the Cut Off value.

Titre of the samples will be the last dilution showing an OD higher than the cut off.

75% of the FIPV-infected cats show titres $\geq 1/6400$.
50% of the FIPV-infected cats show titres $\geq 1/12800$.

On the other hand, only 20% of FECV-infected cats show titres of 1/6400 and only 5% of them, titres of 1/12800.

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:
--	-----------------------