



INGEZIM PARVOVIRUS IgM

Prod Ref: 15.CPM.K2

Ensayo inmunoenzimático de captura, para la detección de IgM específicas del parvovirus canino en suero de perro

Capture immunoenzymatic assay for the detection of specific IgM antibodies to Canine Parvovirus, in dog serum

Ultima revision / Last revision: 13/12/13

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa dividida en tiras de 8 pocillos, antigenadas con AcM específico de IgM de perro. Microtitration strip plate (8x12) coated with dog IgM-specific Mab.	1	-
Vial Suero Control Positivo listo para su uso (no diluir) Vial of Positive Control serum ready to use	1	3,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso (no diluir) Vials of Negative Control serum ready to use	1	3,5 ml
Vial Conjugado peroxidasa (AcM específico para parvovirus canino) concentrado 100x. Vials with Peroxidase Conjugate 100x concentrated	1	350 µl
Frascos conteniendo sustrato TMB Bottles with TMB substrate	1	15 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with 10x concentrated Washing Solution	1	100 ml
Vial con antígeno recombinante concentrado 10x. Vial with 10x concentrated recombinant viral antigen	1	1,5 ml
Frascos de Diluyente de suero y conjugado a la dilución de uso (DE01-01) Bottles with serum and conjugate diluent ready to use (DE01-01)	1	125 ml
Frascos de Solución de Frenado a la dilución de uso (Acido 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 captura cuyo fundamento se detalla a continuación.

En caso tanto de infección como primo-vacunación, existe una alta tasa de anticuerpos IgM frente al CPV. Este tipo de anticuerpos son los detectados en nuestro ensayo. Las placas se suministran tapizadas con un anticuerpo

monoclonal (Acm) específico de IgM de perro.

En cada pocillo se dispensan los sueros problema a valorar. Los anticuerpos IgM presentes en el suero serán capturados por el Acm de la placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el

antígeno viral recombinante que quedará unido al pocillo solo si el suero contenía IgM específicas del parvovirus canino. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de éste antígeno mediante la adición de un Acm conjugado específico del parvovirus marcado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos IgM específicos presentarán una reacción coloreada, proporcional al título o nivel de anticuerpos, 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. 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 manipulan los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
10. Preparar reactivos y muestras según instrucciones indicadas.
11. 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.
12. 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:

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.
- 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 1/100 de los mismos (p. ej. 5 µl de suero en 500 µl de diluyente).

INGEZIM PARVOVIRUS IGM 15.CPM.K.2

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Disolver una parte de solución concentrada en 9 partes de agua destilada. Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- **Antígeno:**
• **Antes de añadir al pocillo** diluir 1/10 en el diluyente suministrado (1,1 ml del antígeno con 10 ml de diluyente es suficiente para una placa. Para una tira de 8 pocillos diluir 0,1 ml de antígeno con 0,9 ml de diluyente).
- **Conjugado**
Hacer una dilución 1/100 en diluyente. Se recomienda diluir únicamente el volumen que

vaya a ser utilizado ya que la solución sobrante ha de ser desechada: (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente es suficiente para una placa. Para una tira de 8 pocillos, 10 µl de conjugado en 1 ml de diluyente).

- **Controles**
Vienen listos para su uso: NO DILUIR

VII. PROCEDIMIENTO

1. Sacar del refrigerador LOS COMPONENTES DEL KIT (EXCEPTO CONJUGADO Y ANTIGENO) y EQUILIBRAR a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de cada muestra por pocillo, preparada según indicaciones previas. Añadir 100 µl de los controles sin diluir (se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles). Cubrir e incubar 15 minutos a 37°C.
3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.
4. Añadir 100 µl del antígeno preparado según indicaciones previas. Cubrir e incubar 15 min a 37°C.
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de conjugado diluido como se ha indicado a cada pocillo. Cubrir e incubar 15 min a 37 °C.
7. Lavar 4 veces.
8. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispuso la solución sustrato.
10. Leer inmediatamente a 450 nm de longitud de onda 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:

Abs450nm control positivo > 1
Abs450nm control negativo < 0.3

Interpretación de los resultados:

Con respecto al valor del control positivo, se determinará el siguiente punto de corte:

Cut off = Abs control positivo x 0,25

Se considerarán:

- ⇒ Muestras negativas: aquellas cuya Abs450 sea ≤ al cut off.
Muestras positivas: aquellas cuya Abs450 sea > al cut off

A pesar de la buena sensibilidad y especificidad de este test, es recomendable que todas las muestras positivas sean confirmadas utilizando otro método diagnóstico. El diagnóstico definitivo no se debe basar en un único resultado. En cualquier caso, éstos resultados deberán contrastarse y relacionarse con otros datos importantes: historia del animal, vacunación y síntomas clínicos.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a capture enzymatic immunoassay. The technique is briefly described below:

If both, primary vaccinations and infections, a high rate of IgM antibodies to CPV are produced. These are the antibodies which are detected in our assay. Plates are coated with a monoclonal antibody specific to dog IgM.

Sera samples are placed in each well. The existing IgM antibodies present in the serum will be captured by the mAb which is coating the plate. After a washing step to remove any unbound material, a recombinant viral antigen should be added and will remain fixed to the well only if the

sera sample contained specific IgMs to canine Parvovirus.

After additional washing steps in order to remove again any unbound material, the presence of the recombinant antigen can be proved by adding a mAb conjugate specific to PPV labelled with peroxidase.

With the further addition of an adequate substrate, those wells with sera samples with containing specific IgM, will show a colorimetric reaction, on proportion to the titre or level of antibodies, whilst on the other hand, those wells where negative sera samples have been ran, no colorimetric reaction will be observed.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

Read the instructions of use carefully.

1. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use. **IMPORTANT!**
2. Do not mix reagents or use instructions from different kits.
3. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different batches.
4. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents and/or samples.
5. Do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. Include a positive and negative control each time the assay is run.
8. The stop solution is a strong acid and should be handled with care.
9. The substrate is very sensitive to light and contamination. It is recommended to pipette a sufficient amount for the assay from the substrate storage bottle into a separate container and discard the remaining volume (never return it to the bottle!).

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents supplied with the kit, should be kept refrigerated between +2 ° C and +8 ° C until use.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING PROCEDURE

The washing of the plates can be done using an automatic plate washer, a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µL on each well, or a squeeze bottle.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µL of washing solution on each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Turn over the plate briskly to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be tested at 1/100 dilution in serum diluent (eg. 5µl of serum in 500µl. of diluent)

INGEZIM PARVOVIRUS IGM 15.CPM.K.2

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution :**
Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit into 9 parts of distilled or deionized water. Once prepared this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.
- **Antigen:**
Before its addition to the well, dilute 1/10 in the diluent provided. (1.1 ml of the recombinant antigen with 10 ml of diluent is enough for one plate. For an 8 well strip dilute 0.1 ml of antigen in 0.9 ml of diluent).
- **Conjugate**
Dilute 1/100 in the conjugate diluent. It is advisable to dilute only the amount of conjugate necessary to run the test, as the remaining solution must be discarded: (110 µl of conjugate in 11 ml of diluent is sufficient for one plate. For an 8 well strip, dilute 10 µl of conjugate in 1 ml of diluent).
- **Controls**
Controls are ready to use: DO NOT DILUTE

VII. TEST PROCEDURE:

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C). (except for the conjugate and the recombinant antigen)
2. Add 100 µL of each sample (prepared according to the instructions above). Then add 100 µL of the positive and negative controls. In order to obtain reliable results, we recommend running samples and controls in duplicate wells. Seal the plate and incubate 15 minutes at 37°C.
3. Wash 4 times following the washing procedure, previously described.
4. Add 100 µL of the antigen, prepared according to previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate 15 minutes at 37°C).
5. Wash 4 times as indicated before.
6. Add 100 µL of the conjugate at the indicated dilution, to each well. Seal the plate and incubate 15 minutes at 37°C.
7. Wash 4 times.
8. Add 100 µL of the TMB substrate to each well. In order to speed up this process, it is advisable to use a multichannel pipette. Keep the plate for 5 min at room temperature.
9. Add 100 µL of the stop solution to each well. We recommend adding this reagent in the same order in which the substrate was added.
10. Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The ODs must be read with an ELISA reader at 450 nm.

If samples and controls are run in duplicate, calculate the arithmetic mean of the OD values obtained.

Validation of the kit:

O.D positive control > 1
O.D negative control < 0,3

Interpretation of the results

The cut off will be calculated using the positive control OD value:

Cut off = OD positive control \times 0,25

Samples should considered:

- ⇒ Negative samples: those with an $OD_{450} \leq$ cut off.
Positive samples: those with an $OD_{450} >$ cut off

Despite the good sensitivity and specificity rates of this test, it is recommended that all positive samples are confirmed using another diagnostic method. The final diagnosis should not be based only on a single test result. In all cases, these results should be corroborated and related to other important information: medical history of the animal, vaccines applied and clinical symptoms.

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: