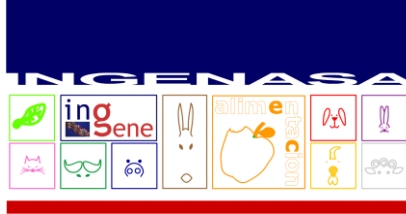


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM PARVO CANINO

Prod Ref: 15.CPV.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto, para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente al parvovirus canino en suero o plasma de perro

Indirect immunoenzymatic assay for detection of antibodies to Canine Parvovirus in dog serum or plasm.

Ultima revision / Last revision: 24-04-08

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa de poliestireno divididas en tiras de 8 pocillos que permite la utilización parcial del kit antigenada con cápsidas obtenidas por expresión de las proteínas vírales en el sistema de baculovirus CPV coated plate (recombinant Virus Like Particles)	1	-
Vial Suero Control Positivo listo para su uso Vial of Positive Control serum ready to use	1	3,5 ml
Vial de suero Control Negativo listo para su uso Vial of Negative Control serum ready to use	1	3,5 ml
Vial Conjugado 100x Vial with Peroxidase Conjugate 100 x	1	350 µl
Vial con sustrato (TMB) Bottle with substrate (TMB)	1	15 ml
Frasco de Solución de Lavado concentrada 10x Bottle with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frasco de Diluyente a la dilución de uso (DE03-01) Bottle with diluent ready to use (DE03-01)	1	125 ml
Frasco de Solución de Frenado a la dilución de uso (Acido Sulfúrico) Bottle with Stop Solution (Sulphuric acid)	1	15 ml

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

El kit se basa en la técnica de los ensayos inmunoenzimáticos de tipo indirecto, cuyo fundamento se explica a continuación:

Se fija un antígeno específico de CPV, sobre un soporte sólido (placa de poliestireno). Cuando en los pocillos de la placa, se añade un suero de perro que contenga anticuerpos específicos frente a CPV, estos se unirán al antígeno de la placa, mientras que cuando el suero no contenga anticuerpos específicos, no acontecerá ninguna unión específica. Tras un paso de lavado en el que se eliminará todo el material no unido de modo específico, la presencia de anticuerpos, podrá detectarse

mediante la adición de un conjugado "anti-IgG de perro" marcado con peroxidasa. Este conjugado quedará específicamente unido a los anticuerpos de perro. Tras lavar nuevamente los pocillos para eliminar el material no unido específicamente, se añadirá un sustrato de la peroxidasa que en presencia de esta, desencadenará una reacción colorimétrica patente.

De este modo aparecerá color en los pocillos en los que el suero ensayado fuera positivo para anticuerpos específicos de CPV y no aparecerá color para los sueros negativos.

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 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 un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. Tanto el sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución..

III. CONSERVACION:

Almacenamiento de los reactivos entre +2°C y +8°C.

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.
- 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:

Hacer una dilución 1:100 en el diluyente suministrado (5µl de suero en 0,5 ml de diluyente).

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.

Preparación de Controles (+) y (-):

Los controles deberán ensayarse sin diluir, ya que se presentan listos para su uso

Preparación del Conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.

Realizar una solución 1/100 en diluyente

⇒ La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente.

⇒ La cantidad necesaria y suficiente para una tira es : 10 µl de conjugado en 1 ml de diluyente.

Homogeneizar bien la solución antes de su utilización

Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Dejar el kit a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de su utilización,
2. Dispensar 100 µl de control positivo en los 2 primeros pocillos de la primera fila de la placa y 100 µl de control negativo en otros 2 pocillos de la fila. Dispensar 100 µl de los sueros problema en el resto de los pocillos de la placa (se recomienda valorar las muestras por duplicado). Tapar la placa e **incubar 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).**
3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado anteriormente.
4. Añadir 100 µl de Conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 10 min. a 18-25°C. (temperatura ambiente).**
5. Lavar 5 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **5 minutos a temperatura ambiente.**
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Es recomendable añadirla en el mismo sentido en que se dispense la solución sustrato.
8. Leer 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 realiza con un lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

El test se considerará válido cuando:

Abs control positivo (+) > 1,2

Abs control negativo (-) < 0.15

En primer lugar se hallará la relación S/P (muestra / control +). Si la muestra tiene una S/P menor de 0.15 se considerará negativa y si es mayor ó igual a 0.15 será positiva.

El título del suero, se determinará en base a la fórmula :

$$Y = 54 (e^{4x})$$

En donde **y** es el título del suero en función de **x** que es la absorbancia de la muestra expresada como S/P. Siendo **e** la base del logaritmo natural (2,718282).

El test es válido puesto que los controles cumplen los requisitos (C+ mayor de 1,2 y C- menor de 0,15).

El título de la muestra será:

EJEMPLO:

Abs. del C + \Rightarrow 1,764

Abs. del C - \Rightarrow 0,08

Abs. de la muestra \Rightarrow 1,202 (S/P = 0.681)

TITULO (y) = 54 (e^{4 * 0.681}) = 824

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 solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera sample, we can detect the presence of dog immunoglobulins 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 dog sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies.

In our kit is important to remark the use of antigen obtained by the expression of the viral proteins in baculovirus growth in insect cell cultures. This method warranties the total absence of infectivity in the kit.

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.
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 handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
10. The substrate and stop solution, handle with care.

III. STORAGE OF THE REAGENTS:

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:

The sera samples needs to be at 1/100 dilution in diluent to be tested (5µl of serum in 0,5 ml of diluent).

VI. PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 9 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

Preparation of the control sera (+) and (-).

Control sera are ready to use. DO NOT DILUTE.

Preparation of the conjugate: to make immediately before use.

Dilute 1/100 with diluent.

- The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of conjugate in 11 ml of diluent.
- The necessary and sufficient quantity of conjugate for an 8 well strip is 10µl of conjugate in 1 ml of diluent.

Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

Shake very well the solution prior to use.

VII. TEST PROCEDURE:

1. Bring all reagents at room temperature before starting the test. (at least. 2 hours)
2. Add 100 µl of positive control serum, to 2 wells of the first row of the plate and 100 µl of the negative control serum to other 2 wells of the first row of the plate. Add 100 µl of sera samples to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate. (for confirmatory purposes test the samples in duplicate wells)
Seal the plate and **incubate for 10 min at room temperature (18-25°C).**
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 10 min at 18-25°C (room temperature).**
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the absorbances of each well with an ELISA reader at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with an ELISA reader at **450 nm**.

Results Validation:

The test is validated when:

- OD 450 Control (+) is higher than 1.2
- OD 450 Control (-) is lower than 0.15

Results Interpretation:

The ratio S/P (sample OD/control+ OD) must be calculated. Samples with S/P lower than 0.15 should be considered negative and samples with S/P ratio higher than 0.15 as should positive to CPV antibodies.

The titre of the sample will be calculated as follow:

$$Y (\text{titre}) = 54 (e^{4x})$$

Where, **e** is the base of natural logarithm (2,718282) and **x** the S/P ratio of the sample.

EXAMPLE:

$$\begin{aligned} \text{OD Control (+)} &\Rightarrow 1,764 \\ \text{OD Control (-)} &\Rightarrow 0,08 \\ \text{OD of sample} &\Rightarrow 1,202 \text{ (S/P = 0.681)} \end{aligned}$$

EI test is valid because (C+) is higher than 1,2 and C (-) is lower than 0,15.

The titre of the sample is:

$$\text{TITRE (y)} = 54e^{4 * 0.681} = 824$$

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:

