



INGEZIM CPV DAS

Prod Ref: 15.CPV.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo, para la detección del Parvovirus Canino en heces

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for canine parvovirus antigen detection in biological specimens (faecal samples)

Ultima revision / Last revision: 17-06-08

COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa de poliestireno antigenada con AcM específicos para CPV Mab-coated plate divided in 12 strips of 8 wells each	1	-
Vial Control Positivo inactivado (100 x) Inactivated positive control 100x	1	150 µl
Viales de Control Negativo inactivado (100x) Inactivated negative control 100x	1	150 µl
Vial Conjugado I específico concentrado 100x (AcM marcado con biotina) Vials with Conjugate I (Mab labelled with Biotin)	1	350 µl
Vial Conjugado II concentrado 100x (estreptavidina marcada con peroxidasa) Vials with conjugate II (Streptavidin labelled with peroxidasa)	1	350 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente I para dilución de muestras y Conjugado I (DE07-01) Bottles with diluent I This diluent is used for the sample dilution as well as diluent for the Conjugate I (De07-01)	2	125 ml
Frascos de Diluyente II para diluir en conjugado II (DE01-01) Bottles with diluent II to dilute the Conjugate II (DE01-01)	1	65 ml
Frasco sustrato (ABTS) para diluir con tampón sustrato Bottle with substrate (ABTS) to dilute with substrate buffer	1	6,5 ml
Frascos tampón sustrato. Bottle with substrate buffer	1	65 ml
Frascos de Solución de Frenado a la dilución de uso (SDS) Bottles with Stop Solution (SDS)	1	65 ml

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (sandwich). Esta técnica muestra grandes ventajas frente al resto de las técnicas usadas hasta ahora: Mayor sensibilidad, mayor especificidad, mayor rapidez de realización y fácilmente automatizable.

Las placas se suministran tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos frente a Parvovirus Canino. Cuando sobre las placas se dispensan las muestras, en el caso de que contengan partículas virales, éstas serán capturadas por los anticuerpos monoclonales de la placa.

Tras lavar para eliminar el material no adherido se añade un segundo monoclonal conjugado con biotina. En presencia de virus, existirá unión del monoclonal a éste y después de incubar con un segundo conjugado (estreptavidina-peroxidasa), podrá revelarse la presencia o no del conjugado mediante la adición de un cromógeno y sustrato adecuado.

Tanto el tapizado como el conjugado I, son una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales específicos que permiten la detección de cualquier cepa de CPV descrita en Europa.

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 manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
9. Utilizar una punta nueva por cada muestra a testar.

III. CONSERVACIÓN

Todos los reactivos que se suministran con el kit, deben mantenerse en refrigeración entre +2°C y +8°C hasta su utilización (¡ATENCIÓN! la solución de frenado puede precipitar a +4 °C, Si ocurre, calentar a +37°C hasta la desaparición del precipitado).

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.

INGEZIM CPV DAS 15.CPV.K2

- 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:

Homogeneizar 1 gramo de la muestra de heces en 2 ml de diluyente I. Después de una buena homogeneización de la muestra, centrifugar a 1000 r.p.m. El sobrenadante obtenido será usado como muestra del ensayo.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit con 24 partes de agua destilada. (40 ml de concentrado 25x más 960 ml de agua destilada). Una vez diluida, la solución permanece estable between +2°C y +8°C

Preparación del conjugado I:

Diluir el concentrado 1/100 en el diluyente I proporcionado. Agitar muy bien antes de usar. Diluir únicamente la cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

Por ej.: 10 µl de conjugado I con 1ml de diluyente I es la cantidad necesaria y suficiente para ocho pocillos.

Preparación del conjugado II:

Diluir 1/100 en el diluyente II. Agitar muy bien antes de usar. Diluir únicamente la

cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

Por ej.: 10 µl de conjugado II con 1ml de diluyente II es la cantidad necesaria y suficiente para ocho pocillos.

- **Preparación de la solución sustrato:**

Mezclar 1 volumen del sustrato proporcionado en el kit con 9 volúmenes de tampón sustrato (ejemplo: 100 µl de sustrato con 900 µl de tampón sustrato es la cantidad necesaria para una fila completa de 8 pocillos). Diluir únicamente la cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

- **Preparación de Controles (+) y (-):**

Preparar la dilución 1/100 de los controles suministrados en el Kit en diluyente I (5 µl de control en 500 µl de diluyente I).

VII. PROCEDIMIENTO

1. Llevar todos los reactivos del kit (excepto conjugados) a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de las muestras problema y de los controles positivo y negativo (diluidos según instrucciones anteriores) a sus respectivos pocillos.
Se recomienda realizar el duplicado de cada muestra. Tapar la placa e **incubar 1 hora a 37 °C.**
3. Vaciar el contenido de la placa en un recipiente que contenga NaOH 0,1 M, y lavar 4 veces siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado I, (preparado siguiendo las instrucciones previas) a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 1 hora a 37 °C.**
5. Lavar 4 veces siguiendo el procedimiento descrito.
6. Añadir 100 µl de conjugado II, preparado según indicaciones previas, a cada pocillo. **Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.**
7. Lavar 4 veces según indicaciones previas.
8. Añadir 100 µl de solución sustrato, preparada según instrucciones anteriores a cada pocillo. **Mantener 10 minutos a temperatura ambiente.**
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
10. Leer a 405 nm con un lector 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:

405 nm

Como valor de cada muestra y controles se tomará la media aritmética con su duplicado.

1.- Validación del kit:

Abs_{405nm} control positivo
----- > **10**
Abs_{405nm} control negativo

2.- Interpretación de los resultados:

El valor del cut off es el 20 % de la absorbancia a 405 nm del control positivo.

Cut off= 0,2 x Abs 405 nm control positivo

Muestras con una Abs 405 mayor al Cut off serán consideradas positivas a CPV. Muestras con una Abs 405 menor que el Cut Off serán consideradas negativas a CPV.

I. TECHNICAL BASIS

The kit is based on a **Double antibody sandwich enzyme immunoassay**. This technique shows big advantages from the rest of the technique used till now: more sensitivity, more specificity, faster to do and easily automatizable.

Here we describe the technical basis of the assay: and specific monoclonal antibody (Mab) against CPV is coated on a solid support (polystyrene plate). When a sample containing viral antigen is added, the Mab will capture the viral particles. After washing to remove all material not bound to the plate, we add a second specific Mab to CPV labelled with biotin (conjugated I). This Mab will bind

to it, and after incubation with a second conjugate (streptavidin-peroxidase), we could demonstrate the presence of this conjugate (conjugate II) by adding a chromogenic substrate that in presence of the enzyme will produce a colorimetric reaction.

The use of these very specific and stable Mabs, warrants the objectivity, specificity, safety and accuracy of the assay.

The coating Mab as well as the conjugate Mab, are mixtures of very specific Mabs that allow the detection of any of the CPV strains described in Europe.

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. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
9. Use a new tip for each serum sample.

III. STORAGE OF THE REAGENTS:

Store between +2°C and +8°C. (ATTENTION! Stop solution may precipitate at this temperature, if it occurs, warm at 37°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:

1. Throw out the content of 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.
 2. Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
 3. Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells
 4. Turn over the plate brusquely to empty the wells.
 5. Repeat the process as much times as is indicated on the instructions of the kit.
 6. 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.
 7. After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.
- **ATTENTION!** you are working with biologic material that could contain infectious agents. All rejected material needs to be sterilised. We recommend using a recipient containing NaOH to through out the liquids after washing. After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Homogenise 1 gr of the faeces sample in 2 ml of diluent I. After a good homogenisation of the sample, centrifuge the homogenate at 1000 r.p.m. The supernatant obtained will be used as the assay sample..

VI. PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water(40 ml of concentrate solution and 960 ml of water). Once this solution ready, it remains stable between +2°C and +8°C.

Preparation of the control (+) and (-)

Prepare a 1/100 dilution of the controls provided with the kit in sample diluent (5 µl of control in 500 µl of diluent I).

Preparation of the conjugate I: to make immediately before use.

Dilute 1/100 the needed quantity of conjugate with diluent I (e.g. 10 µl of conjugate I with 1 ml of diluent I is more than enough quantity for a strip of 8 wells). Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

Preparation of the conjugate II: to make immediately before use.

Dilute 1/100 the needed quantity of conjugate II into diluent II (e.g. 10 µl of conjugate II with 1 ml of diluent II, is enough quantity for a strip of 8 wells). Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

Preparation of the substrate solution: to make immediately before use:

Mix 1 volume of the substrate provided in the kit with 9 volumes of substrate buffer (e.i. 100 µl of substrate with 0.9 ml of substrate buffer is the quantity needed for one complete strip of 8 wells). Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

VII. TEST PROCEDURE:

1. Take out the plate (or strips to be used) and Bring to room temperature before starting the test.
2. Add 100 µl of positive control, diluted as it's specified in the previous instructions, to one well (e.i. A1) and 100 µl of the negative control (prepared as is specified before) to another well (e.i. B1). Add 100 µl of each sample to test on each remainder wells. We recommend running the samples in duplicate wells. Seal the plate and **incubate for 1h a 37°C**.
3. Throw away the liquid contained in the plate on a recipient containing NaOH 0.1 M. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate I, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 1 h a t 37°C**.
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of Conjugate II, prepared following the previous instruction, to each well. **Incubate 15 minutes at room temperature (25°C)**.
7. Wash 4 times more following the described procedure.
8. Add 100 µl of substrate solution, prepared following previous instruction, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**.
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Read the absorbances with a spectrophotometer at 405 nm within 5 min after the addiction of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Read the OD of each well with and ELISA reader at **405 mn**.

Kit Validation

$$\frac{\text{OD Positive control}}{\text{OD Negative control}} > 10$$

Results interpretation

CUT OFF = 0,2 x (OD Positive Control)

- ⇒ Samples with OD values, higher than Cut off value, must be considered as positive to CPV antigen.
- ⇒ Samples with OD values, lower than Cut off value, must be considered as negative to CPV antigen.

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:

