

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM PCV DAS

Prod Ref: 11.CIR.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para control de carga viral en vacunas de Circovirus Porcino tipo II mediante titulación

Double antibody sandwich enzymatic immunoassay for Control of the viral load of porcine Circovirus type II in vaccines by titration.

Última revisión / Last revision: 13-01-17

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placas (2x8x12 pocillos) 1 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	1	-
Control Positivo (Listo para su uso) Positive Control (Ready to use)	1	1,5 ml
Control Negativo (Listo para su uso) Negative Control (Ready to use)	1	1,5 ml
Viales de Conjugado listo para su uso (AcM anti vp2-HRPO) Vials with Conjugate ready to use (Mab anti-vp2-HRPO)	1	15 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	65 ml
Frascos de Diluyente (DE01-05) (5x concentrado) Bottles with serum diluent (DE01-05) (5x concentrated)	1	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	15 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	15 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.
Micropipettes 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 TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para la detección semicuantitativa de la proteína VP2 del circovirus porcino tipo II. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de doble anticuerpo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija un anticuerpo monoclonal específico de la VP2. Cuando se añaden las muestras en el caso de contener virus, estos quedarán

unidos al AcM. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa, otro AcM específico de la VP2 viral. En el caso de que las muestras contuvieran virus, el conjugado se unirá a este. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

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.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir el control positivo y el control negativo siempre que se utilice el kit.
10. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al bote el sustrato sobrante.

III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

IV. INFORMACIÓN 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. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

• **Solución de lavado :**

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado mas 960 de agua destilada).

• **Diluyente :**

Diluir una parte del diluyente 5x concentrado, suministrada con el kit en 4 partes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 400 de agua).

Preparación del conjugado:

- **Se encuentra listo para su uso. No diluir.**
- **Preparación de los controles:**
- **Se encuentran listos para su uso. No diluir.**

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Muestras vacunales. Realizar diluciones de la muestra en el diluyente proporcionado. Se recomienda hacer varias diluciones, normalmente desde la 1/25 en adelante, aunque esta dilución depende mucho de la muestra ensayada.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de la muestra y controles:**
Dispensar 100 µl del control positivo así como del negativo **por duplicado**. Dispensar seguidamente 100 µl de las diluciones de las muestras (preparadas según instrucciones anteriores) también por duplicado. Tapar la placa e incubar **1 hora a temperatura ambiente**.
4. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30 min a temperatura ambiente**.
6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente
7. Añadir a cada pocillo 100 µl de sustrato. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
9. Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La lectura se realizará a 450nm

A) Validación del test:

El test se considerará válido cuando la DO del control positivo sea superior a 0.8 y la DO control negativo inferior a 0.3

B) Interpretación de resultados:

El contenido viral de la muestra estará en relación directa al título obtenido en el ensayo.

El título obtenido por una muestra depende del criterio del usuario. En general, un criterio ampliamente aceptado para establecer un título es el de la última dilución cuya DO sea superior a la del control negativo multiplicado por tres.

C) EJEMPLO:

- 1) DO del control negativo = 0.092
- 2) DO del control positivo: = 2.065
- 3) DO del control negativo x 3 = 0,092 x 3 = 0,276

	Muestra 1	Muestra 2
25	3,357	4,99
50	1,843	3,742
100	0,896	2,17
200	0,497	1,121
400	0,317	0,61
800	0,236	0,359
1600	0,152	0,242
3200	0,122	0,143

El título de la muestra 1 sería de 1/400 mientras el de la muestra 2 sería de 1/800.

INGEZIM PCV DAS

11.CIR.K2

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed for the semiquantitative detection of circovirus VP2 protein.

The INGEZIM PCV DAS kit is based on the double antibody sandwich immunoassay technique it described below:

The solid phases are plates coated with a monoclonal antibody (MAb) specific of circovirus VP2. After adding the sample to the well, if it contains virus, they will bind

to the MAb absorbed to the plate. If the sample does not contain virus they will not bind to the MAb. After washing to eliminate the not adsorbed material, a MAb specific to VP2 conjugated with peroxidase is added. If there was virus in the sample, the conjugate will bind to the antigen. This union is detected after adding a substrate able to develop colour in presence of peroxidase.

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. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

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 REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water (i.e. 40 ml of concentrate and 960 ml of water).
- **Diluent :**
Dilute 1 part of 5x concentrated diluent with 4 parts of distilled or deionised water (100 ml of concentrate and 400 ml of water).
- **Preparation of conjugate:**
It is ready to use. Do not dilute.
- **Preparation of positive and negative control.**
They are ready to use. Do not dilute.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Vaccine samples must be assayed at two fold dilutions from 1/25 in the supplied diluent. It is recommended to make several dilutions because the absorbance obtained depends on the viral charge of the sample.

VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Sample and controls:**
Add to the respective wells 100 µl of positive and negative control in duplicate. Add 100 µl of dilutions of the samples (prepared as it is described above) in duplicated.
- Seal the plate and incubate **1 hour at room temperature**.
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate 30 minutes at room temperature**.
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate to each well and incubate for **15 minutes** at room temperature. (Count the time since the first well had been filled).
- Add 100 µl of stop solution to each well. **ATTENTION:** The stop solution must be dispensed in the same order in which the substrate was added.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Read the OD at 450 nm

A) Validation of the test:

The test will be valid if:

- The OD obtained with the positive control is higher than 0.8
- The OD obtained with the negative control is lower than 0.3

B) Interpretation of the results:

The viral charge of the sample will be directly proportional to its titer.

The sample titer depends on the user criteria. One general way to define a titer is the last dilution showing an OD higher than negative control OD multiplied by 3

C) Example:

- Negative control OD = 0.092
- Positive control OD = 2.065
- Negative control OD x 3 = 0,092 x 3 = 0,276

	Sample 1	Sample 2
25	3,357	4,99
50	1,843	3,742
100	0,896	2,17
200	0,497	1,121
400	0,317	0,61
800	0,236	0,359
1600	0,152	0,242
3200	0,122	0,143

The titer of Sample 1 will be 1/400 and the sample 2 1/800.

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: