



## INGEZIM CIRCO IgG

Prod Ref: 11.PCV.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdo.

Indirect immunoenzymatic assay for detection and/or titration of antibodies to Circovirus in porcine serum.

Última revisión / Last revision: 08-06-11

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divided into 12 strips of 8 wells each)	2		5	-
Viales de suero Control Positivo listo para su uso Vials positive control serum ready to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	2 ml	2	2 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa listo para su uso. Vials with peroxidasa conjugate ready to use	1	30 ml	2	30 ml
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente de suero 5X (DE01-05) Bottles with serum diluent 5X (DE01-05)	1	100 ml	1	100 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	65 ml	1	65 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 µl.  
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.  
Micropipets from 5 to 200 µl.  
Disposable micropipette tips.  
Washing plates device.  
Test tubes from 50 to 250 ml  
ELISA Reader (450 nm filter)

## I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de cerdo mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente a la enfermedad, mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

Con esta técnica, pretendemos facilitar y automatizar el diagnóstico de esta enfermedad, que hasta el momento es de muy difícil seguimiento.

En nuestro kit es de resaltar la utilización de antígeno viral obtenido por ingeniería genética, más concretamente por expresión de proteínas virales mayoritarias y de máximo poder antigénico, en el sistema de baculovirus. Esto garantiza la total ausencia de infectividad en cualquiera de los componentes del kit.

## 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. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.
10. Para cada utilización del kit, preparar una solución de sustrato fresca.
11. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.

## III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes 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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infectivos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el 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:

Realizar la dilución 1/200 en el diluyente suministrado (5 µl de suero en 1 ml de diluyente)

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

### • **Solución de lavado 25x :**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (p.ej. para 1 L de solución de lavado mezclar 40 ml de concentrado y 960 ml de agua destilada) .

Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

### • **Diluyente 5x :**

Diluir una parte del diluyente concentrado

con 4 partes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 400 ml de agua)

### • **Sueros Controles (+) y (-) :**

Los sueros controles vienen listos para su uso. No diluir.

### • **Conjugado:**

El conjugado se presenta listo para su uso. No diluir.

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Añadir 100 µl de cada suero problema preparado según instrucciones anteriores (es recomendable hacer las muestras por duplicado para mayor seguridad en los resultados). Añadir 100 µl de los controles también por duplicado. Tapar la placa e incubar **1 h a temperatura ambiente (20-25°C)**
3. Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C)**.
5. Lavar 6 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato, en cada pocillo. Mantener la reacción **10 minutos a temperatura ambiente**. Con el fin de agilizar este proceso se recomienda el uso de una pipeta multicanal.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.
8. Leer 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 RESULTADOS:

### 1. Validación del ensayo

El test se considerará válido cuando:

- La DO del **Control Negativo (CN)** sea menor que **0.35**
- La DO del **Control Positivo (CP)** sea mayor que **0.7**

### 2. Interpretación:

Cuando se corran muestras por duplicado se tomará como valor la media aritmética de la DO de ambos pocillos.

#### • **Cálculo de puntos de corte:**

Los puntos de corte se calculan como sigue:

Punto de corte negativo = DO CN + 0.2

Punto de corte positivo = DO CN + 0.25

Donde CN = Control Negativo

Muestras con DO superiores al punto de corte positivo serán consideradas positivas a PCV. Muestras con DO menores que el punto de corte negativo serán consideradas negativas y

las muestras con DO entre ambos puntos de corte se considerarán dudosas.

#### • **Título de las muestras:**

El título de las muestras positivas se determinará de la siguiente manera:

- a) Calcular el cociente M/P

$M/P = DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del control positivo}$

El título se calculará utilizando la siguiente fórmula

**Título = 53 ( $e^{3.2 \times x}$ )**

Donde, **e** es la base del logaritmo natural y **x** es el cociente M/P de la muestra

**3. Ejemplo:**

<b>Control +</b>	<b>1.006</b>
<b>Control -</b>	<b>0,254</b>
<b><u>Muestra</u></b>	<b><u>OD</u></b>
Muestra "1"	0.858

1. **Validación:**

DO Control positivo = 1,006 (> 0,7)  
DO Control negativo = 0,254 (< 0,35)

2. **Cálculo de puntos de corte:**

$$0.254 + 0,2 = 0,454$$

$$0.254 + 0.25 = 0504$$

Muestra = 0,858 →→ positiva (> 0,504)

3. **Título de la muestra "1"**

- MS/P (x)  
 $x = 0,858 / 1,006 = 0.852$
- Cálculo del título:  
Título =  $53 (e^{3.2 \times 0.852}) = 810$

# INGEZIM CIRCO IgG

## 11.PCV.K1

### I. TECHNICAL BASIS

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

The antigen (PCV recombinant protein) is fixed in a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the serum sample does not contain specific antibodies they will not bind the antigen. If we add a specific monoclonal antibody against the porcine immunoglobulins (conjugated with peroxidase), it will

bind the antibodies of the serum. If the serum sample contains specific antibodies, conjugate will bind them, whereas if it does not contain specific antibodies the conjugate will be eliminated in the following washing step. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled conjugate by adding the specific substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

The antigen coated to the plate in our kit consists of a soluble recombinant protein from the virus.

### II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions for 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 expiry 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. Substrate and substrate buffer must be handled with care.
10. For each utilisation of the Kit use a fresh substrate preparation.
11. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.

### III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored entre +2°C y +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 SAMPLE

Samples to be used in the assay must be porcine sera.

1/200 dilution of the sera must be done in diluent (5 µl of sera and 1 ml of diluent).

### VI. 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. mix 40 ml of concentrate with 960 ml of water to prepare 1L of working washing solution). When ready this solution remains stable at +4°

#### • **Control sera:**

Controls are supplied ready to use. Do not dilute

#### • **Diluent:**

Dilute one part of the concentrate diluent with 4 parts of distilled or deionised water (mix 100 ml of

concentrate with 400 ml of water). When ready this solution remains stable at +4°

• **Conjugate:**

Conjugate is supplied ready to use. Do not dilute

## VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 100 µl of positive control serum to two wells (e.g. A1 and B1), and 100 µl of the negative control serum to other two wells (e.g. A2 and B2). Add 100 µl of sera samples to test (prepared as specified in point VI), on each remainder wells. We recommend the use of two wells per sample. **Seal the plate and incubate for 1 h at room temperature.**
- Wash four times as specified in point V.
- Add 100 µl of conjugate to each well Cover the plate and **incubate the plate for 30 minutes at room temperature.**
- Wash 6 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate **for 10 min at room temperature.**
- Add 100 µl of stop solution, to each well.
- Read the OD of each well at 450nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

### 1. Validation of the test

The test could be considered valid when:

- ⇒ The OD of the **Negative Control** (NC) is lower than **0,35**
- ⇒ The OD of the **Positive Control** (PC) is higher than **0,7**

### 2. Interpretation:

If samples are analyzed in duplicate, OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

• **Cut Off calculation:**

The cut off must be calculated as follow:

- Negative Cut off = OD negative control+0.2
- Positive Cut off = OD negative control+0.25

Samples with OD higher than positive cut off value should be considered positive to PCV antibodies. Samples with OD lower than negative cut off value should be considered negative. OD between both cut off will be considered doubtful.

• **Titre of the sample:**

The titre of positive samples will be determined as follow:

- a) Calculate the S/P

S/P = OD of sample / OD of positive control

- b) Titre is calculated as follow

$$\text{Titre} = 53 (e^{3.2 \times x})$$

Where, **e** is the natural logarithm base and **x** is the S/P of the sample

### 4. Example:

<u>Serum</u>	<u>OD</u>
<b>Control +</b>	<b>1.006</b>
<b>Control -</b>	<b>0,254</b>
<u>Sample</u>	<u>OD</u>
Sample "1"	0.858

4. **Validation:**  
Positive control OD value = 1,006 (> 0,7)  
Negative control OD value = 0,254 (< 0,35)

5. **Cut off calculation**  
0.254 + 0,2 = 0,454  
0.254 + 0.25 = 0504  
Sample OD = 0,858 →→ positive (> 0,504)

6. **Titre of sample "1"**  
S/P (x)  
x = 0,858 / 1,006 = 0.852  
Titre calculation:  
Titre = 53 (e<sup>3.2 × 0.852</sup>) = 810

Desarrollado y fabricado en España por:  
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.  
C/ Hnos. García Noblejas, 39  
28037- MADRID (SPAIN)  
Tif: +34 91368.05.01/04  
Fax: +34 91 408.75.98  
E-mail: [ingenasa@ingenasa.com](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)



Distributed in by: