



## INGEZIM Circovirus IgG/IgM

Prod Ref: 11.PCV.K2

Ensayo inmunoenzimático de captura para la detección de anticuerpos tipo IgM e IgG específicos de Circovirus porcino tipo 2 en suero de cerdo.

Capture immunoenzymatic assay for detection of antibodies specific of Porcine Circovirus type 2 IgG and IgM in porcine sera samples.

Última revisión / Last revision: 04-02-08  
Registrado por el MAPA nº 805 RD

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

| Reactivo<br>Reagent  | 4 placas<br>(4x8x12 pocillos)<br>4 plates box<br>(4x8x12 wells) |        |
|--|---|--------|
|  | Uni.  | Vol.   |
| Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras anti IgG<br>96 Well microtitration plates (divided into 12 strips of 8 wells each) anti IgG | 2   | -      |
| Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras anti IgM<br>96 Well microtitration plates (divided into 12 strips of 8 wells each) anti IgM | 2   | -      |
| Viales de suero Control Positivo IgG listo para su uso<br>Vials positive IgG control serum ready to use  | 1   | 4 ml   |
| Viales de suero Control Positivo IgM listo para su uso<br>Vials positive IgM control serum ready to use  | 1   | 4 ml   |
| Viales de suero Control Negativo listo para su uso<br>Vials negative control serum ready to use  | 1   | 4 ml   |
| Viales de antígeno recombinante listo para su uso.<br>Vials with recombinant antigen ready for use   | 1   | 50 ml  |
| Viales de Conjugado Peroxidasa 100x.<br>Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated  | 1   | 700 µl |
| Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada<br>Bottles with Washing Solution 25x concentrated  | 1   | 125 ml |
| Frascos de Diluyente DE10-01<br>Bottles with diluent DE10-01   | 2   | 125 ml |
| Frascos de Sustrato (TMB)<br>Bottles with Substrate (TMB)  | 1   | 65 ml  |
| Frascos de Solución de Frenado<br>Bottles with Stop Solution   | 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 la técnica del inmunoensayo enzimático de captura cuyo fundamento se detalla a continuación.

Dos anticuerpos monoclonales (AcMs), uno específico de IgG de cerdo y otro específico de IgM son fijados a placas diferentes. Cuando las muestras se añaden a las placas los anticuerpos IgM e IgG presentes en el suero serán capturados por el AcM de cada placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno (cápsidas vacías recombinantes de circovirus) que quedará unido al pocillo solo si el

suero contenía IgM y/o IgG específicas del circovirus tipo 2.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de éste antígeno mediante la adición de un AcM específico del circovirus conjugado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos IgM y/o IgG específicos presentarán una reacción coloreada, 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.
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 sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. 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.
11. 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. 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 1/100 en el diluyente DE10-01 (5 µl de suero en 0,5 ml de diluyente)

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

### ♦ Solución de lavado 25x :

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 2,4 litros de agua). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

### ♦ Diluyente :

El diluyente viene listo para uso. No diluir.

### ♦ Sueros Controles (+) y (-) :

Los sueros controles vienen listos para su uso. No diluir. Hay un control positivo para IgG, otro para IgM y un único control negativo.

### ♦ Antígeno:

El antígeno se presenta listo para su uso en una solución coloreada. No diluir

### ♦ Conjugado:

Realizar una dilución 1/100 en diluyente inmediatamente antes de su utilización (10 µl en 990 µl de diluyente es la cantidad necesaria para una tira; 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente, es la cantidad necesaria por placa).

Agitar muy 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. Sacar del refrigerador los componentes del kit (excepto conjugado) y equilibrar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo.
2. Añadir 100 µl de cada muestra y de los controles tanto a pocillos de la placa IgG como IgM (añadir el control negativo a ambas placas y cada control positivo a su placa correspondiente). Se recomienda hacer por duplicado tanto las muestras como los controles. Cubrir e **incubar 1 hora a 37°C**.
3. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.
4. Añadir 100 µl del antígeno. Cubrir e **incubar 30 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 30 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 RESULTADOS:

### 1. Validación del ensayo

Realizar la lectura en un lector de ELISA a **450 nm**. El test se considerará válido cuando:

- **DO controles positivos en sus pocillos IgG e IgM correspondientes sean mayores de 0.7**
- **DO control negativo en pocillo IgG e IgM sea menor de 0,3**

### 2. Interpretación de resultados:

#### ♦ PUNTO DE CORTE IgM

D.O. 450 nm control positivo IgM x 0.4

#### ♦ PUNTO DE CORTE IgG

D.O. 450 nm control positivo IgG x 0.3

Si se ensayan las muestras y controles por duplicado el valor de DO será la media aritmética de ambos pocillos.

#### • MUESTRAS CON VALORES DE ABSORBANCIA MENORES QUE LOS PUNTOS DE CORTE

Aquellas muestras cuyos valores de DO, tanto para IgG como para IgM, sean menores que los puntos de corte se considerarán como muestras con títulos para circovirus menores o iguales a 1/100. Estos se

corresponderían con animales negativos o que hayan tenido un contacto con el virus hace mucho tiempo.

#### • MUESTRAS CON VALORES DE ABSORBANCIA MAYORES QUE LOS PUNTOS DE CORTE:

En este caso se pueden distinguir entre 3 tipos de muestras:

- IgM > IgG: infección activa
- IgG > IgM y título de IgM > 1/100: infección recientemente (entre uno y dos meses)
- IgG > IgM y título de IgM < 1/100: Contacto viral menos reciente que el caso anterior.



# INGEZIM Circovirus IgG / IgM

## 11.PCV.K2

### I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a capture enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

Two monoclonal antibodies (Mabs) specific for pig IgM and IgG are fixed on different plates. When a pig serum is added on each plate, the IgMs and IgGs present in the sample are captured by the Mab adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non fixed material from the serum sample, we add the viral antigen (recombinant empty capsid) which is captured by the IgM and/or IgG only if the pig serum sample contained specific immunoglobulin M or G to PCV.

After additional washing we add a peroxidase-conjugated Mab specific to PCV2. After washing and addition of the substrate a colorimetric reaction will be developed which could be measured by an ELISA reader.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies IgM or IgG against the virus in the pig sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies.

The aim of this kit is to provide the users with a reliable diagnostic technique for this disease.

### 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. **¡IMPORTANT!**
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
6. Avoid any contamination of the reagents
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Substrate is very sensitive to light and contamination. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
10. For each utilisation of the kit, control positive and negative sera must be tested in a systematic way.

### III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components 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 SAMPLE

The sera samples needs to be at **1/100 dilution** in diluent to be tested.

### VI. PREPARATION OF REAGENTS

#### • **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water (i.e. 100ml of

concentrate and 2,4 L of water). When ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

- **Preparation of the control sera (+) and (-) :**  
Controls are ready to use. Do not dilute. There are a positive control for IgM, a positive control for IgG and only a negative control for both.

- **Preparation of the recombinant viral antigen:**

Antigen is 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 a 8 wells 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. All reagents and wells to be used must be allowed to come to room temperature before use (except conjugate).
2. Add 100 µl of diluted sera samples and positive and negative controls to IgM and IgG wells (the negative control to both and the positive controls to corresponding wells). We recommend to run the test (samples sera and controls), in duplicates. Seal the plate and **incubate for 60 minutes at 37°C**.
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of antigen to each well. Seal the plate and **incubate 30 minutes at 37°C**
5. Wash 4 times following the described procedure
6. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at 37°C**.
7. Wash 4 times following the described procedure.
8. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature**.
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Read the absorbances with an ELISA reader at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading must be done at **450 nm**.

### 1. Validation of the test

The test is valid when:

- **O.D positive control in IgG and IgM wells are higher than 0.7**
- **O.D negative control in IgG and IgM wells are lower than 0,3**

### 2. Results Interpretation:

Using the corresponding positive control value, the cut off points for IgG and IgM must be calculated as follows:

- **CUT OFF: IgM**  
O.D 450 nm IgM positive control x 0.4
- **CUT OFF: IgG**  
O.D 450 nm IgG positive control x 0.3

If samples in duplicate wells are run, the OD value for the sample will be the mean of both values.

- **SAMPLES WITH OD VALUES < CUT OFFS**  
These kind of samples have titre lower or equal than 1/100, (for IgG and/or IgM). These values corresponds with negative animals or animals with a very old contact with virus
- **SAMPLES WITH OD VALUES > CUT OFFS:**  
In this case you could distinguish three kind of samples:

- IgM > IgG OD value: Active infection
- IgG > IgM OD value and IgM titre > 1/100: Recent infection (between one or two months)
- IgG > IgM OD value and IgM titre < 1/100: Old infection by Circovirus.

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:

