

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM CORONA CANINO

Prod Ref: 15.CCV.K1

Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos frente a coronavirus canino, en suero de perro.

Indirect immunoenzymatic assay for detection of antibodies to Canine coronavirus in canine sera samples.

Ultima revision / Last revision: 27-05-13

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (8x12 pocillos) 1 plate box (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa dividida en tiras de 8 pocillos, tapizada con antígeno purificado de Coronavirus canino. Canine Coronavirus antigen coated plate	1	-
Vial Suero Control Positivo Vial of Positive Control serum	1	100 µl
Viales de suero Control Negativo Vials of Negative Control serum	1	100 µl
Vial Conjugado peroxidasa 100x Vials with Peroxidase Conjugate 100 x	1	350 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 10x Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 ml
Frascos de Diluyente (DE01-01) Bottles with diluent (DE01-01)	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (listo para usar) Bottles with substrate ready to use	1	15 ml
Frascos de Solución de Frenado a la dilución de uso (Acido Sulfúrico) Bottles with Stop Solution (Sulphuric acid)	1	15 ml

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de tipo indirecto (**ELISA Indirecto**), cuyo fundamento se describe brevemente a continuación:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno específico de coronavirus canino. Sobre los pocillos así antigenados, se dispensan los sueros a testar. En el caso de existir anticuerpos específicos frente al antígeno de la placa, estos se unirán mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Tras lavar la placa eliminando el material no adherido, revelaremos la presencia de anticuerpos específicamente inmovilizados en él pocillo, mediante la adición de un

anticuerpo monoclonal específico de IgG de perro conjugado con peroxidasa, añadiendo posteriormente el sustrato del enzima que en presencia de ésta dará lugar a una reacción colorimétrica. La aparición de color indicará la presencia de anticuerpos en el suero analizado.

En el caso de interesar el título de anticuerpos presentes en el suero, deberán hacerse diferentes diluciones del mismo y llevar a cabo el análisis con cada una de estas diluciones. El título vendrá dado por la mayor dilución en la que puedan detectarse la presencia de anticuerpos de manera significativa.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización. **IMPORTANTE**
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
5. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
9. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado (ácido) han de ser manipulados con precaución.
10. El sustrato es muy sensible a la luz y contaminaciones. Es imprescindible, por tanto, retirar la cantidad necesaria del frasco por decantación o usando una pipeta estéril. **NO DEVOLVER** al bote el sustrato sobrante

III. CONSERVACION:

Recomendamos el almacenamiento de todos los componentes entre +2°C y +8°C.

Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

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.

INGEZIM CORONA CANINO 15.CCV.K1

- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento. 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:

Para la titulación de los sueros, se recomienda realizar el número de diluciones que se consideren en base 2 a partir de la 1/50 (recomendamos un mínimo de 4 diluciones 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400)..

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir 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 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 de 8 pocillos 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..

Preparación de los controles:

Se tratan igual que las muestras (1/50,1/100,1/200,1/400)

VII. PROCEDIMIENTO

1. Sacar las placas, separar el número de placas o tiras que se necesiten. Las placas y reactivos a utilizar deben permanecer a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de su utilización.
2. Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones realizadas según procedimiento anterior de control positivo en los 4 primeros pocillos de la primera fila de la placa y 100 µl de cada dilución de control negativo en los 4 pocillos restantes de la fila. Dispensar 100 µl de cada dilución de los sueros problema en el resto de los pocillos de la placa. **Tapar la placa e incubar 10 min a temperatura ambiente (18-25°C).**
3. Lavar tres veces la placa según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. **Tapar la placa e incubar 10 minutos a 25°C (temperatura ambiente).**
5. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato. Mantener la reacción **5 minutos a temperatura ambiente.** Resulta conveniente la utilización de una pipeta multicanal para agilizar el proceso de revelado.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Es recomendable añadirla en el mismo sentido en que se dispuso el sustrato.
8. Leer a 450nm de longitud de onda en los siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

La lectura se realiza con un lector de ELISA a una longitud de onda de **450 nm**.

Validación del test:

Para que el resultado del kit se considere válido, han de cumplirse los siguientes valores:

DO₄₅₀ Control Negativo < 0.4

Título del suero Control Positivo ≥ 1/200.

Interpretación de resultados:

El punto de corte positivo/negativo equivale a una absorbancia de 0.4. De manera que las muestras con valores de absorbancia superiores a 0.4 se consideraran positivas y por debajo de este valor, se considerarán negativas. En el caso de buscar el título del suero, este será la máxima dilución que presente un valor de absorbancia superior a 0,4.

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 specific 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 an specific peroxidase conjugate.

After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which could be measured by an 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.

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. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
9. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
10. Avoid any contamination of the reagents of the Kit. Take special care of substrate because is very sensitive to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C.

Once opened, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°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:

For the sera **TITRATION**, we recommend to make at least four two fold dilutions starting from the 1/50 dilution for each serum sample (1/50, 1/100, 1/200, 1/400).

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 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 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.

CONTROL SERA.

Dilute as samples (1/50,1/100,1/200, 1/400).

VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of each positive control dilution on the first 4 wells of the first strip and 100 µl of the negative control dilutions on the remainder wells of the strip. Add 100 µl of each sera samples dilution to test, prepared following the previous instructions, on the remainder strips of the plate. Seal the plate and incubate for **10 minutes** at room temperature.
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 minutes** at 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 a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

Kit Validation:

The test could be validated when:

O.D 450 nm negative control < 0,4
Titre of positive control ≥ 1/200

Results Interpretation:

The cut off value is equivalent to an O.D 450 nm = **0,4**

Positive samples: Samples with an OD higher than Cut off value.

Negative samples: Samples with an OD lower than the Cut off value.

For sera titration: The titre would be the maximum dilution with an O.D 450 nm higher than Cut off value.

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:

