



AGROLABO
PARVO Ag ELISA

PARVO Ag ELISA

Kit ELISA per la determinazione degli antigeni del Parvovirus canino in campioni fecali

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica ELISA a doppio anticorpo monoclonale.

Un anticorpo monoclonale specifico contro il Parvovirus canino (CPV) è adeso ai pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare. Se il campione in esame contiene l'antigene del CPV, questo si legherà all'anticorpo adeso. Dopo un ciclo di lavaggio, per rimuovere il materiale non legato, si aggiunge un secondo anticorpo monoclonale anti-CPV coniugato con biotina (coniugato I). Il coniugato I si legherà al complesso Ab-Ag. Viene quindi aggiunto un altro anticorpo, coniugato con streptavidina-perossidasi (coniugato II), che si legherà al complesso precedentemente formatosi tramite il legame biotina-streptavidina. Dopo una serie di lavaggi viene aggiunto il substrato che, in presenza dell'enzima perossidasi, sviluppa una reazione colorimetrica.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - 100X;
- 1 flacone di controllo negativo - 100X;
- 1 flacone di coniugato I (biotina) - 100X;
- 1 flacone di coniugato II (streptavidina-perossidasi) - 100X;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 25X;
- 2 flaconi di diluente I - pronti all'uso;
- 1 flacone di diluente II - pronto all'uso;
- 1 flacone di substrato (ABTS) - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop (SDS) - pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Provette per la preparazione dei campioni; pipette di precisione e puntali; incubatore +37°C; spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 405 nm.

PRECAUZIONI

1. Leggere attentamente le istruzioni.
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) prima dell'uso.
3. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit.
4. La soluzione di stop può causare irritazione. Manipolare con cura.
5. Non utilizzare i reagenti dopo la loro data di scadenza.
6. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso.
7. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo.
8. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione da analizzare.
9. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione.
10. Preparare i campioni secondo le istruzioni.
11. Evitare ogni contaminazione dei reagenti.
12. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C.

LAVAGGIO DEI POZZETTI

Le operazioni di lavaggio possono essere effettuate con un lavatore automatico di piastre o con una pipetta multicanale in modo da dispensare un volume di 300 µl in ogni pozzetto. Dopo le incubazioni, le operazioni di lavaggio devono essere effettuate seguendo queste istruzioni:

- rovesciare il contenuto dei pozzetti in un apposito contenitore, con un movimento deciso al fine di evitare la contaminazione tra pozzetti adiacenti,
- dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto,
- agitare delicatamente la piastra, evitando contaminazione tra i pozzetti vicini,
- rovesciare la piastra per svuotare i pozzetti,
- ripetere il lavaggio tante volte quante indicate nelle istruzioni del kit,
- prima dell'ultima operazione di rovesciamento della piastra, accertarsi che il reagente da utilizzare di seguito sia pronto,
- non lasciare i pozzetti asciutti più del tempo necessario per dispensare il reagente del passaggio successivo,
- dopo l'ultimo passaggio di lavaggio la piastra deve essere asciugata su un foglio di carta assorbente.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Omogenizzare 1 gr di feci in 2 ml di diluente I. Centrifugare l'omogenato. Utilizzare il surnatante come campione.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio

Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 24 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 40 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 960 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

Controllo Positivo e Negativo

Diluire **1:100** i controlli forniti con il diluente I (es. 5 µl di controlli in 500 µl di diluente I).

Coniugato I

Deve essere preparato immediatamente prima dell'uso. Diluire la quantità richiesta di coniugato I con il diluente I (**1:100**). Mescolare la soluzione prima dell'uso. Preparare solo la quantità necessaria e non riutilizzare la quantità avanzata.

Coniugato II

Deve essere preparato immediatamente prima dell'uso. Diluire la quantità richiesta di coniugato II con il diluente II (**1:100**). Mescolare la soluzione prima dell'uso. Preparare solo la quantità necessaria e non riutilizzare la quantità avanzata.

PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 100 µl di controllo positivo diluito e 100 µl di controllo negativo diluito in due pozzetti consecutivi. Aggiungere 100 µl dei campioni da analizzare, preparati secondo le istruzioni precedenti, nei pozzetti rimanenti.

Coprire ed incubare la piastra per 1 ora a +37°C.

3. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio descritta nel paragrafo precedente.
4. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato I preparato secondo le istruzioni precedenti. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogenizzazione dei reagenti.

Coprire ed incubare la piastra per 1 ora a +37°C.

5. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio descritta nel paragrafo precedente.
6. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato II preparato secondo le istruzioni precedenti.

Coprire ed incubare la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente.

7. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio descritta nel paragrafo precedente.
8. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di substrato.

Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente.

9. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop.
10. Misurare il valore di assorbanza di ogni pozzetto con un lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 405 nm.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 405 nm. Se i campioni sono stati testati in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica dell'assorbanza dei 2 pozzetti.

Validazione del test

Il test è considerato valido se:

$$\frac{\text{OD controllo positivo}}{\text{OD controllo negativo}} > 10$$

Determinazione del valore di CUT-OFF:

Cut-off = OD controllo positivo x 0,2

Interpretazione dei risultati:

Campioni Positivi: campioni con valore di OD maggiore del valore di cut-off.

Campioni Negativi: campioni con valore di OD minore del valore di cut-off.

PARVO Ag ELISA

Kit ELISA for the detection of Canine Parvovirus antigen in faecal samples

TEST PRINCIPLE

The test is performed as a double antibody sandwich enzymatic immunoassay. A specific monoclonal antibody against the Canine Parvovirus (CPV) is fixed on the wells of the plate. The samples to be analyzed are distributed in each well. When a sample containing the antigen of CPV is added, the antigen will bind to the monoclonal antibody adsorbed. After a wash cycle, to remove all material not bound to the plate, a second monoclonal antibody anti-CPV labeled with biotin (conjugate I) is added. The conjugate I bound the Ab-Ag complex. Another monoclonal antibody labeled with streptavidin-peroxidase (conjugate II) is then added, which will bind to the complex previously formed via the biotin-streptavidin bond. All non-fixed material is removed by washing. A specific substrate is then added to the wells which causes a colorimetric reaction when the conjugate is present.

TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control - 100X;
- 1 dropper of negative control - 100X;
- 1 dropper of conjugate I (biotin) - 100X;
- 1 dropper of conjugate II (streptavidin labeled with peroxidase) - 100X;
- 1 bottle of washing solution - 25X;
- 2 bottles of diluent I - ready for use;
- 1 bottle of diluent II - ready for use;
- 1 dropper of substrate (ABTS) - ready for use;
- 1 dropper of stop solution (SDS) - ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Test tubes for samples preparation; precision pipettes and tips; +37 °C incubator; spectrophotometer at a wavelength of 405 nm.

PRECAUTIONS

1. Read the instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (+20-25 °C) prior to use.
3. Do not substitute or mix instructions or reagents from different kits or lots.
4. The stop solution may cause irritation. Handle with care.
5. Do not use components after expiry date.
6. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled.
7. In each utilization of the kit the positive and negative controls must be tested.
8. Use a new tip for each sample.
9. Observe each incubation time.
10. Prepare each sample according to instructions.
11. Avoid any contamination of the reagents.
12. All kit components must be stored at +2-8 °C.

WASHING STEPS

The washing steps may be carried out using an automated plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well. After the incubation, the washing steps should be carried out according to the following instructions:

- throw out the content of the plate by vigorously turning the plate over to avoid the possible mixture of the content from one well to another,
- dispense a volume of 300 µl of wash buffer into each well,
- shake the plate gently, avoiding contamination between wells,
- turn over the plate and tap the wells vigorously to remove the wash buffer,
- repeat the process as many times as is indicated by the kit's instructions,
- prior to emptying out the plate's contents during the final washing step, ensure that the next reagent to be added to the plate is ready to use,
- the wells should not be left dry for any longer than strictly necessary in order to dispense the reagent of the following step,
- after the last washing step, blot the empty wells face down on clean paper towels or absorbent paper to remove residual wash buffer.

PREPARATION OF SAMPLES

Homogenise 1 gr of the faeces sample in 2 ml of diluent I. Centrifuge the homogenate. Use the supernatant as sample for the assay.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer solution:

Dilute one part of the wash buffer supplied into 24 parts of distilled or deionized water (ie. 40 ml of concentrated wash buffer with 960 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution may be stored at +2-8°C.

Positive and Negative Controls

Prepare a **1:100** dilution of the controls provided with the kit with the diluent I (ie. 5 µl of controls in 500 µl of diluent I).

Conjugate I

To be prepared immediately prior to use. Dilute the required amount of conjugate I (**1:100**) with the diluent I. Mix the solution prior to use. Prepare only the required amount and do not reuse surplus conjugate.

Conjugate II

To be prepared immediately prior to use. Dilute the required amount of conjugate II (**1:100**) with the diluent II. Mix the solution prior to use. Prepare only the required amount and do not reuse surplus conjugate.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.
2. Add 100 µl of diluted positive and negative control in two different wells. Add 100 µl of each sample to be tested on the remainder wells of the plate.
Seal the plate and incubate at +37°C for 1 hour.
3. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate I, prepared following the previous instructions, to each well. Delicately shake the plate to obtain a correct homogenization of the reagents.
Seal the plate and incubate at +37°C for 1 hour.
5. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
6. Add 100 µl of conjugate II, prepared following the previous instructions, to each well.
Seal the plate and incubate at room temperature for 15 minutes.
7. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
8. Add 100 µl of substrate solution to each well.
Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Measure the absorbance value of each well with a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm.

READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 405 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD value for the samples or controls will be the mean of both wells.

Test Validation:

The test is to be considered valid when:

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

CUT-OFF value determination

Cut-off = OD Positive control x 0.2

Interpretation of the results

Positive samples: samples with an OD higher than the cut-off value.

Negative samples: samples with an OD lower than the cut-off value.



AGROLABO

Manufactured by;

Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories

and Production Centre

Diagnostic Division

Via Masero 59

10100 Scarmagno (TO)

Italy

Tel +39 0125 731111

Fax +39 0125 731190

E-mail agrolabo@agrolabo.it

www.agrolabo.it

shop.agrolabo.it