AGROLABO

FCoV ELISA Ab 96 WELLS

FCoV Ab ELISA 96 wells

Kit ELISA per la determinazione degli anticorpi specifici verso i Coronavirus felini in campioni di siero o plasma di gatto

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA indiretta. I pozzetti della piastra sono sensibilizzati con un peptide antigenico di Feline Coronavirus (FCoV). In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare. Se il campione in esame contiene specifici anticorpi anti-FCoV (campione positivo), questi anticorpi si legheranno all'antigene adeso ai pozzetti formando il complesso Ag-Ab.

Dopo una serie di lavaggi, al fine di eliminare tutto il materiale non legato, gli anticorpi anti-FCoV presenti nel campione verranno evidenziati da un anticorpo monoclonale specifico e marcato con perossidasi. Dopo un secondo lavaggio per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato/cromogeno, che si legherà esclusivamente al coniugato, sviluppando una reazione colorimetrica. La presenza di colore indicherà che il siero in esame contiene anticorpi specifici anti-FCoV; in caso di negatività del campione il pozzetto corrispondente rimarrà incolore.

COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso;
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso;
- 1 flacone di coniugato - 100X;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X;
- 1 flacone di diluente - pronto all'uso;
- 1 flacone di substrato - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop - pronta all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Provette e tubi per la diluizione dei campioni; pipette di precisione e puntali; spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 450 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. Evitare ogni contaminazione dei reagenti.
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. Tutti 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
Campioni di siero o plasma di gatto.
Eseguire una diluizione **1:200** di ciascun campione con il diluente (es. 5 µl di siero in 1 ml di diluente).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI
Soluzione di lavaggio
Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 9 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 100 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 900 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

Coniugato
Deve essere preparato immediatamente prima dell'uso. Diluire la quantità richiesta di coniugato con la soluzione diluente per il siero (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 e 100 µl di controllo negativo in due pozzetti successivi. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl dei sieri precedentemente diluiti.
   Coprire ed incubare la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente.
3. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
4. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato precedentemente diluito. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogeneizzazione dei reagenti.
   Coprire ed incubare la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente.
5. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
6. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di substrato.
   Incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente.
7. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione stop.
8. Misurare il valore di assorbanza di ogni pozzetto (OD) con un lettore di piastra alla lunghezza d'onda di 450 nm.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Se i campioni sono stati condotti in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica sia dei campioni che dei controlli.

Validazione del test

Il test è considerato valido se:
Controllo positivo: OD = 0,90 ± 0,30
Controllo negativo: OD ≤ 0,20

Determinazione dei valori di CUT-OFF

Cut-off = OD controllo negativo x 4

Interpretazione dei risultati

SCREENING

- **Campioni POSITIVI**: sono da considerare positivi i campioni il cui valore di assorbanza è superiore al valore del Cut-off.
- **Campioni NEGATIVI**: sono da considerare negativi i campioni il cui valore di assorbanza è inferiore al valore del Cut-off.

TITOLAZIONE

Il titolo anticorpale è rappresentato dalla diluizione più alta il cui valore di assorbanza del campione è maggiore del Cut-off.

Il 75% dei gatti FIP positivi presenta titoli anticorpali ≥ 1:6400 ed il 50% ha titoli ≥ 1:12800. D'altro canto solo il 20% dei gatti Coronavirus positivi presenta titoli di 1:6400 e solo il 5% di questi hanno titoli di 1:12800.

FCoV Ab ELISA 96 wells

Kit ELISA for the detection of specific antibodies to Feline Coronavirus in feline serum or plasma samples

TEST PRINCIPLE

The test is performed as an indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA). The polystyrene wells are coated with an antigenic peptide of Feline Coronavirus (FCoV). The samples to be analyzed are distributed in each well. If the sample contains specific antibodies against the virus (positive sample), these antibodies will bind to the antigen adsorbed on the wells, forming the Ag-Ab complex. After washing to eliminate all non-fixed material, the presence of anti-FCoV antibodies is detected by a specific monoclonal antibody labelled peroxidase (conjugate) added to the wells. All non-fixed material is removed by washing. A specific enzyme substrate is then added to the wells which causes a colour change reaction when antibodies are present. The presence of colour, therefore, detects the presence of feline immunoglobulins in sera (positive sample), while the absence of colour indicates the absence of specific antibodies (negative sample).

TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control – ready for use;
- 1 dropper of negative control – ready for use;
- 1 dropper of peroxidase conjugate -100X;
- 1 bottle of washing solution - 10X;
- 1 bottle of diluent - ready for use;
- 1 dropper of substrate -ready for use;
- 1 dropper of stop solution -ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Test tubes for serum dilutions; precision pipettes and tips; spectrophotometer at a wavelength of 450 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. Avoid any contamination of the reagents.
5. Do not use components after expiry date.
6. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled.
7. Use a positive and negative control for each sample to be tested.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Observe each incubation time.
10. Prepare each sample according to instructions.
11. 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

Feline serum or plasma samples.
Prepare a **1:200** dilution of each sample to be tested using diluent (ie. 5 µl of serum in 1 ml of diluent)

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer solution:
Dilute one part of the wash buffer supplied into 9 parts of distilled or deionized water (ie. 100 ml of concentrated wash buffer with 900 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution may be stored at +2-8°C.

Conjugate:
To be prepared immediately prior to use. Dilute the required amount of conjugate 1:100 with the diluent solution. 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 positive and negative controls in two wells. Add 100 µl of each dilution of the sera on the remainder wells of the plate. **Seal the plate and incubate at room temperature for 30 minutes.**
3. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
4. Dispense 100 µl of previously prepared conjugate into each microwell. Delicately shake the plate. **Seal the plate and incubate at room temperature for 15 minutes.**
5. Repeat the wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
6. Add 100 µl of substrate to each well. **Seal the plate and incubate at room temperature for 5 minutes.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Measure the absorbance value of each well with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 450 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD value for the sample or controls will be the mean of both wells.

Test Validation:
The test is to be considered valid when:
Positive Control: OD = 0,90 ± 0,30
Negative Control: OD ≤ 0,20

CUT-OFF value determination:
Cut-off = OD negative control x 4

SCREENING:
- **Positive Samples**: samples with an OD higher than the cut-off value.
- **Negative Samples**: samples with an OD lower than the cut-off value.

TITRATION:
The antibody titre of the sample is represented by the highest dilution of serum that has an absorbance value higher than the cut off.

75% of the FIP-infected cats show titres ≥ 1:6400. 50% of the FIP-infected cats show titres ≥ 1:12800.
On the other hand, only 20% of FCoV-infected cats show titres of 1:6400 and only 5% of them titres of 1:12800.

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