



INGEZIM PPA DAS 2.0

Prod Ref: 11.PPA.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección del virus de la peste porcina africana en sangre completa, cultivo celular y bazo

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for African swine fever virus antigen detection in whole blood, cellular culture and spleen.

Última revisión / Last revision: 12-08-20
Nº REGISTRO: 3465RD

Version 12-08-20:

Uso de nuevo diluyente de suero / *Use of new serum diluent*

Dilución de las muestras 1/2 / *Sample dilution 1/2*

Cambio de cut off / *Modification of cut off*

Conjugado listo para su uso / *Conjugate ready to use*

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (1x8x12 pocillo) 2 plates box (1x8x12 well)		5 placas (1x8x12 pocillo) 5 plates box (1x8x12 well)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos 96 Well microtitration coated plates (divided in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de Control Positivo Vials with positive control	1	0.25 ml	1	0.25 ml
Viales de Control Negativo Vials with negative control	1	0.25 ml	1	0.25 ml
Viales de Conjugado peroxidasa listo para uso Vials with peroxidasa conjugate ready to use	1	30 ml	2	30 ml
Fascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Diluyente (DE-13) Bottles with diluent (DE-13)	1	125 ml	2	125 ml
Fascos de Sustrato ABTS Bottles with ABTS Substrate	1	30 ml	1	60 ml
Fascos 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 405 nm)
Estomacher o mortero manual
Centrífuga

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 (405 nm filter)
Stomacher
Centrifuge

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (Elisa DAS). Esta técnica presenta grandes ventajas frente al resto de las técnicas tradicionalmente utilizadas: mayor índice de sensibilidad, especificidad, rapidez y fácil automatización.

A continuación se describe brevemente el fundamento de esta técnica:

Las placas se suministran tapizadas de un anticuerpo monoclonal específico frente a VP72 de VPPA. Cuando sobre los pocillos de dicha placa, se depositan las muestras, en el caso de que exista presencia de antígeno de VPPA, éste será

capturado por los anticuerpos inmovilizados en la placa. Tras lavar para eliminar el material no capturado, se añade un conjugado específico (anticuerpo monoclonal frente a VP72 de VPPA marcado con peroxidasa), capaz de reconocer al virus que ha quedado capturado. Para revelar la reacción se utilizará un sustrato específico de la peroxidasa, el ABTS. La presencia de color indicará por tanto la existencia de virus en la muestra. La utilización de estos anticuerpos monoclonales, de gran especificidad y estabilidad, hace que los resultados de este ensayo sean fiables, objetivos y reproducibles.

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. Usar únicamente agua destilada para la preparación de los reactivos.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo.
10. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener 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.

La solución de frenado precipita entre +2°C y +8°C. Antes de utilizar calentar a 37°C para disolver el precipitado.

IV. INFORMACIÓN 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, las muestras 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. PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Solución de lavado:**
 Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml más 960 ml de agua).
- Control (+) y (-):**
 Una vez abiertos, son estables entre +2°C y +8°C un máximo de 1 mes. En caso de prever su uso a más largo plazo se recomienda distribuirlos en alícuotas
- Preparación del conjugado y sustrato:**
 Se presentan listo para su uso (no diluir) Atemperar y añadir 100 µl a cada pocillo
- y almacenarlos hasta su uso a -20°C. Antes de añadir a la placa, realizar una dilución 1/50 en diluyente.

VI. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El tipo de muestra utilizado debe ser de sangre completa, bazo o cultivo celular.

Para **muestras de sangre completa** con anticoagulantes, antes de ensayarse han de sufrir un proceso de congelación / descongelación para evitar fondos y falsos positivos. La muestra, se ensaya a dilución 1/2 (50 µl de diluyente + 50 µl de muestra por pocillo).

Para **bazo** ha de realizarse una dilución 1/10 (peso/volumen) en el diluyente suministrado en el kit (p. ej. 1g de muestra con 10 ml de diluyente) Asegurarse de una buena homogenización usando un Stomacher o cualquier otro homogenizador mecánico. A continuación, centrifugar o filtrar para eliminar los restos de tejido y aplicar 100 µl al pocillo

VII. PROCEDIMIENTO

- Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
- Dispensar 100 µl de control positivo (preparado según instrucciones anteriores) en los dos primeros pocillos, 100 µl de control negativo en otros dos pocillos. Dispensar 100 µl de cada una de las muestras en los pocillos restantes preparada según instrucciones anteriores (si la muestra es sangre y la dilución se hace directamente en el pocillo añadir en primer lugar el diluyente y en segundo lugar la sangre). Es recomendable testar las muestras también por duplicado. Tapar la placa e **incubar 1 hora a 37°C**.
- Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0,1M y lavar 4 veces según procedimiento descrito.
- Añadir 100 µl de Conjugado en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 1 hora a temperatura ambiente (20°-25°C)**.
- Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
- Añadir 100 µl de solución sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción **durante 15 minutos a temperatura ambiente**.
- Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato. **¡ATENCIÓN! La solución de frenado contiene detergente y puede formar espuma. Evitar dispensar burbujas sobre la placa ya que podría interferir en la lectura de los resultados.**
- Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 405 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Validación del test:

El ensayo se considerará válido siempre que se cumpla los siguientes resultados:

$$DO \text{ (Control Negativo)} \leq 0,15$$

$$DO \text{ (Control Positivo)} \geq 1$$

Interpretación de resultados:

En el caso de haber ensayado las muestras por duplicado, deberá hallarse para cada muestra la media aritmética de las DO obtenidas.

- Cuando el valor de DO sea igual superior a 0.250, la muestra se considerará positiva para antígeno de PPA.
- Cuando el valor de DO sea igual o inferior a 0.200, la muestra se considerará negativa para antígeno de PPA.
- Para resultados de DO comprendidos entre ambos valores, las muestras serán consideradas dudosas. En estos casos deberá repetirse el ensayo y de repetirse el resultado, utilizar otra técnica o recoger una nueva muestra del individuo.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a double antibody sandwich enzymatic immunoassay (DAS or capture Elisa). We make a brief description of the technique below:

The plate is coated with a specific monoclonal antibody (Mab) to VP72 of the ASFV. In this way when a sample is added into the wells, if they contain antigen, the coated Mabs will catch it. After washing a second Mab to VP72 (specific for a different epitope) conjugated with Peroxidase, is added.

If there is antigen captured into the well, the conjugate (Mab, labelled with peroxidase) will bind it and the peroxidase action will be detected after adding the adequate substrate.

Samples to be used in the assay could be any tissue suspected to be infected. For diagnoses purposes, we recommend to use as sample, blood, spleen or lymphatic nodes (tissues in which viral concentration could be high).

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use instructions 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 expiration 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 handle.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample. Use only distilled water for the preparation of the reagents.
9. For each utilisation of the kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way
10. Substrate and substrate buffer must be handle with care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All components 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.

WARNING! Stop Solution may precipitate, if it happens, warm it at +37°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 REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the 25x concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable at +4°

- **Controls:**

Before use a 1/50 dilution must be done in diluent. Once opened, controls are stable for 1 month between +2°C and +8°C.

For long term storage, we recommend to make aliquots of the controls and store it at -20°C till use.

- **Preparation of the conjugate and substrate:** do not dilute. Ready to use solution, add 100 µl/well

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

For diagnosis purposes, samples must be whole blood, spleen or cellular culture.

For whole blood (with heparin or EDTA), before use, samples must be frozen and thawed once to avoid false positives results.

Samples are used at 1/2 dilution (50 µl of diluent and 50µl of sample/well).

For spleen, a 1/10 dilution must be done (w/v) using the diluent supplied (i.e. 1g of sample in 10 ml of diluent). Make a good homogenisation of the sample dilution using a stomacher or any other mechanic homogenizer. Filter or centrifuge the homogenized material to remove tissue debris and add 100 µl to the well

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive control to two wells (e.g. A1 and B1), and 100 µl of the negative control (e.g. A2 and B2). Add 100 µl of samples to test on each remainder wells (if the sample is whole blood you can make the dilution directly in the well adding in first place the diluent and in second place the sample). We recommend the use of two wells per sample. Seal the plate and incubate **for 1 h at 37°C**.
3. **Empty the wells into a receptacle containing 0.1 M NaOH** and wash four times as specified in point IV.
4. Add 100 µl of specific conjugate to each well. Seal the plate and incubate for **1 hour at room temperature (20-25°C)**.
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature**.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well at 405nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Validation of the test

The test could be considered valid when:

The OD of the Positive control is higher that 1.0

The OD of the Negative control is lower that 0,150

Interpretation:

When you are running duplicates, OD of the sample, will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

- Samples with an OD equal or higher than 0.250 must be considered as **POSITIVES** to ASFV.
- Samples with OD equal or lower that 0,200 must be considered as **NEGATIVE** to ASFV.
- Samples with OD values between both values are considered as **DOUBTFUL**. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this sample

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

INMUNOLOGIA Y GENETICA
APLICADA, S.A.
Av. Institución Libre de
Enseñanza, 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: