



INGEZIM PPR COMPAC

Prod Ref: 13.PPR.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente al virus de la peste de los pequeños rumiantes en muestras de suero.

Blocking immunoenzymatic assay for detection of antibodies specific for Peste des petits ruminants virus (virus of small ruminants) in serum samples.

Última revisión / Last revision: 06-05-2018

Nº registro en España/ Spanish Registration number: 3780 RD

Version 06-05-18: Cambio de punto de corte /*change of cut off*

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates		10 Placas (T) 10 Plates	
	Unid	vol	Unid	vol	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-	5	-	10	-
Viales conteniendo Control Positivo para PPR listo para su uso Vials containing Positive Control to PPR ready to use	1	4 ml	2	4 ml	4	4 ml
Viales conteniendo Control Negativo para PPR listo para su uso Vials containing Negative Control serum to PPR ready to use	1	4 ml	2	4 ml	4	4 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) listo para su uso. Vials with conjugate (MAb peroxidase conjugated) ready to use	1	30 ml	2	30 ml	4	30 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml	1	250 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01) Bottles containing diluent (DE01-01)	1	125 ml	1	125 ml	1	250 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml	2	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stop solution	1	65 ml	1	65 ml	2	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.
Micropipettes 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

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPR), en ganado ovino principalmente, aunque susceptible de ser utilizado con muestras de otros rumiantes. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno de PPR (proteína N recombinante). Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa. (anticuerpo monoclonal específico de la proteínaN).

En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición del sustrato adecuado, el cual desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa (es decir en presencia del monoclonal conjugado con peroxidasa). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos del virus PPR y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

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. **¡IMPORTANTE!** El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
11. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (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.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último 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 una dilución 1/5 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 80 µl de

diluyente y luego 20 µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

• *Solución de lavado:*

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua).

• *Controles positivo y negativo:*

Los controles se presentan listos para su uso. **(NO DILUIR)**. Añadir 100 µl de los controles a los pocillos.

• *Preparación del conjugado:*

El conjugado se presenta listo para su uso. Añadir 100 µl del conjugado a los pocillos **(NO DILUIR)**.

VII. PROCEDIMIENTO

Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.

1. **Adición de los sueros:**

- Añadir 80 µl de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar. Añadir 20 µl de los sueros problema a ensayar. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla. Utilizar una punta limpia para cada muestra.
- Añadir 100 µl de control positivo a dos pocillos y 100 µl de control negativo a otros dos pocillos.

2. Tapar la placa e incubar **durante 45 min a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$**

3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.

4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30 min. a temperatura ambiente ($22-25^{\circ}\text{C}$)**.

5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.

6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante **10 minutos a temperatura ambiente** en oscuridad. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).

7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. **ATENCIÓN:** La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.

8. Leer los valores de absorbancia a 450nm antes de los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Validación del test:

- El valor de absorbancia (DO 450 nm) del Control Negativo debe ser mayor de 0.8.
- Ha de cumplirse la siguiente relación:

$$\frac{\text{Control Positivo}}{\text{Control Negativo}} < 0.3$$

B. Interpretación de resultados:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO

obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

Para calcular el % de bloqueo:

$$\% = 100 - ((\text{DO muestra} / \text{DO control negativo}) \times 100)$$

- Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a PPR), cuando su % de bloqueo sea mayor o igual al 50%
- Las muestras se considerarán **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a PPR), cuando su % de bloqueo sea menor del 50%

I. TECHNICAL BASIS

The Kit has been designed to detect, in a very easy way, specific antibodies to PPR in sera samples. The assay has been developed to use mainly in sheep but it can be used for other ruminants. This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

The PPR antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). The serum sample is added to each well. After incubation, we add a monoclonal antibody peroxidase conjugated specific to PPR. If the serum sample do not contains antibodies against the virus, the

conjugate will bind to the plate, whereas if it contains specific antibodies to PPR, these antibodies will bind the antigen on the plate blocking the binding of the conjugate, that's why no binding of the conjugate will be appreciated.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled conjugate by adding the substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction. Due to the high specificity of the monoclonal used as conjugate, the assay has a high specificity and sensitivity index.

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.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit's reagents.
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 handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
10. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates 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 SAMPLES:

A 1/5 dilution must be made before assaying the sample. This dilution could be made

directly on each well by adding 80µl of serum diluent and 20µl of serum sample and mixing properly.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

• *Washing solution:*

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml de concentrated solution and 960 ml of water). Once ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

• *Preparation of controls:*

Controls are ready to use (**DO NOT DILUTE**) and must be handled adding 100 µl/well.

• *Preparation of the conjugate:*

The conjugate is ready to use (**DO NOT DILUTE**) and must be handled adding 100 µl/well.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 80 µl of diluent to all the wells to be used with samples.
 - Add 20 µl of serum samples to each well plate. Shake carefully the plate to help the correct homogenisation.
 - Add 100 µl of Positive and Negative controls in duplicated wells.

Seal the plate and **incubate for 45 min at 37 ± 1°C**.
3. Wash 3 times following the described procedure
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 30 min at room temperature (22-25°C)**
5. Wash 6 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature, in a dark place**.
7. Add 100 µl/well of stop solution. NOTE: Stop solution must be added in the order in which the substrate was added.
8. Read the OD of each well at 450 nm with a spectrophotometer within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

A. Validation criteria:

- OD of Negative control >0.8
- To validate the assay, the ratio OD (positive Control) / OD (negative control) must be lower than 0.3

B. Results Interpretation:

Calculate the blocking % of each samples as follow:

$$\text{Blocking \%} = 100 - ((\text{OD sample} / \text{OD negative control}) \times 100)$$

- All samples with blocking % higher than or equal to 50% must be considered Positive.
- All samples with blocking % lower than 50% must be considered Negative.

When samples were run in duplicate, arithmetic mean of both values must be calculated for each sample.

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
www.ingenasa.es



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2

Distributed in

by:

