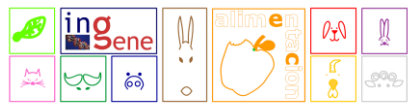


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



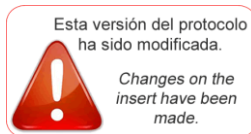
INGEZIM MAL ROJO

Prod Ref: 11.MR.K1

Ensayo inmunoenzimático para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos de Erysipelotrix rhusiopathiae en suero porcino

Indirect immunoenzymatic assay for detection and/or titration of antibodies to porcine erysipelas (Erysipelotrix rhusiopathiae), in pig serum

Última revisión / LasT revision: 24-03-2015



COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo listo para su uso Vials positive control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	300 µl	2	300 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente 5x concentrado (DE01-05) Bottles with diluent 5x concentrated (DE01-05)	1	100 ml	1	100 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) Bottles with Substrate (ABTS)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos 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)

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)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto) . A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de suero de cerdo mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una

reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente a la enfermedad, mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

Dependiendo de las necesidades el kit puede utilizarse para diferenciar animales que presentan anticuerpos frente a la enfermedad de los que no los presentan (screening), utilizando un pocillo por suero, o para conocer el título de anticuerpos que presenta un animal en concreto, utilizando diferentes diluciones de cada suero (titulación).

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. Para cada utilización del kit, preparar una solución de sustrato fresca.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución

III. CONSERVACIÓN DEL KIT

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.

La solución de frenado podría precipitar en refrigeración. La precipitación desaparecerá después de unos minutos a temperatura ambiente.

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, los sueros problema 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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para realización de **screening y/o determinación del título a pocillo único**, los sueros problema se utilizarán a la dilución 1/200 (2 µl de suero hasta 400 µl con diluyente).

Si se quiere **titular**, se prepararan diluciones en base 2 a partir de la 1/200 y hasta el punto que se considere necesario (normalmente hasta la 1/1600).

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- ♦ **Solución de lavado :**
Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada. Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- ♦ **Diluyente :**
Diluir el volumen de diluyente concentrado 5x suministrado en el kit con 4 volúmenes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 400 ml de agua). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- ♦ **Preparación de Controles (+) y (-) :**
Los controles vienen listos para su uso. A partir de aquí realizar diluciones de factor 2 para titular.
- ♦ **Preparación del conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar una solución 1/100 en diluyente .
→ Para una placa la cantidad necesaria y suficiente de conjugado es : 110 µl de conjugado hasta 11 ml en diluyente.

INGEZIM MAL ROJO

11.MR.K1

→ Para una tira la cantidad necesaria y suficiente de conjugado es : 10 µl de conjugado en 1ml de diluyente.

Agitar muy bien la solución antes de su utilización.

Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

◆ **Preparación de sustrato:**

Listo para usar

VII. PROCEDIMIENTO:

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Añadir 100 µl de cada muestra a testar diluida como se ha descrito previamente. En caso de screening se recomienda poner las muestras por duplicado. Hacer lo mismo con el control (+) y Control (-). Sellar la placa con la tapa adhesiva e **incubar 1h a 37°C**.
3. Lavar tres veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según las

- instrucciones anteriores a cada pocillo. Sellar la placa en **incubar a 45 minutos a 37°C**.
5. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la **reacción 15 minutos a temperatura ambiente**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
7. Frenar la reacción añadiendo 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
8. Leer a 405 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La lectura se realiza a una longitud de onda de **405 nm**.

A) VALIDACIÓN DEL TEST:

El test se considerara válido cuando:

- D.O. (Control +) > 1,5
- D.O. (Control -) < 0,3

B) CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE:

Las muestras se consideraran positivas cuando el valor de Absorbancia que se obtenga sea superior al Cut Off Positivo y Negativas cuando sea inferior al Cut Off Negativo. Las muestras que presenten valores de Absorbancia entre ambos valores deberán considerarse dudosas.

El título de la muestra será la mayor dilución que presente un valor de Absorbancia igual o superior al Cut off Positivo.

C) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Cut Off Positivo = Media de D.O. (Control -) + 0.2

Cut Off Negativo = Media de D.O. (Control -) + 0.1

IX. TITULACIÓN A POCILLO ÚNICO:

El título de las muestras positivas se obtendrá aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{TITULO (Y)} = 156 (e^{3,6x})$$

En donde **e** es la base del logaritmo natural (2,718282); **x** es la DO de la muestra expresada como relación S/P (DO muestra / DO del Control +)

EJEMPLO:

1. Resultados del ensayo:

Media DO Control (+)	= 2.130
Media DO Control (-)	= 0.105
DO muestra 1 a la 1/200	= 0.709
DO muestra 1 a la 1/400	= 0.372
DO muestra 1 a la 1/800	= 0.242
DO muestra 1 a la 1/1600	= 0.164

2. Interpretación:

La muestra 1 es positiva puesto que a la dilución 1/200 presenta una D.O mayor al Punto de Corte Positivo. La muestra tiene un título de 1/400 ya que es la mayor dilución cuyo valor de Absorbancia supera el Cut Off Positivo.

$$\text{TITULO (Y)} = 156 (e^{3,6 \times 0,333}) = 517$$

I. TECHNICAL BASIS

The Kit has been designed to detect, in a very easy way, specific antibodies to E. rhusiopathiae in pig

sera samples. This Kit is based on an indirect enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique bellow:

The 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 porcine immunoglobulins. If the serum sample contains antibodies against the bacteria, the conjugate will bind to the plate, whereas if it does not contain specific antibodies 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.

The major advantage of this assay is that could be applied not only for screening proposes, but also for titration. By this way seroconversion process of the animals could be monitored easily.

The aim of this kit is provide to the users a reliable and automatizable diagnostic technique for this disease that till this time is been made by the agglutination test.

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.
9. For each utilisation of the Kit use a fresh substrate preparation.
10. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.
11. Substrate and substrate buffer must by handle whit care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2°C y +8°C.

ATTENTION! Stop solution may precipitate at +this temperature, if it happens, warm at 37°C till total dissolution.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps could be done using an automatic washing machine or a multichanel 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 **screening and/or one well titration**, serum samples must be tested at dilution 1/200 in diluent.

E.I. 2 µl of serum sample in 400 µl of diluent.

For **titration purposes**, we recommend to assay 4 two-fold dilutions for each sample (1/200,

1/400, 1/800 and 1/1600). For your facility, this step could be done directly on the plate.

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. When ready this solution remains stable between +2°C and +8°C.
 - **Diluent:**
Dilute 1 volume of diluent 5x concentrated supplied in the Kit with 4 volume of distilled or deionized water (i.e. 100 ml of diluent with 400 ml of water). Store this solution between +2°C and +8°C.
 - **Preparation of the conjugate: to make immediately before use:**
Dilute the needed quantity of conjugate provided in the Kit 1/100 with diluent:
 - ⇒ The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of Conjugate with 11 ml of diluent.
 - ⇒ The necessary and sufficient quantity of Conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate with 1 ml of diluent.
- Shake very well the solution before use.
Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.
- **Control Sera:**
Controls are supplied ready to use. For titration make two fold dilution
 - **Substrate:**
Ready to use

VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of Positive and Negative control sera, to two wells. Add 100 µl of each dilution of serum samples to be assayed to the remainder wells. **Seal the plate and incubate 1 hour at 37°C.**
3. Wash 3 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Shake. **Seal the plate and incubate for 45 at +37°C.**
5. Wash 3 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well
8. Read at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

The reading must be done with a spectrophotometer at 405 nm.

a). Validation of the assay:

The assay will be valid only when:

1. OD of positive control is higher than 1,500.
2. OD of negative control is lower than 0,300.

b). Cut off calculation:

- ⇒ Positive Cut off = OD of negative control plus 0,200
- ⇒ Negative Cut off = OD of negative control plus 0,100.

c). Result interpretation:

- For screening purposes:
 - All samples with an OD value higher than positive cut off must be considered positives.
 - All samples with an OD value lower than negative cut off, must be considered negatives.
 - Samples with OD values between both Cut off values, must be considered as doubtful. In this cases a new test of the samples is needed.
- For titration purposes:
The titre of each sample will be the highest dilution which develop a positive result (OD value higher that Cut off value).

d). Example

- 1). Assay date:
 Mean OD Control + = 2.130
 Mean OD Control - = 0.105
 OD Sample 1 1/200 = 0.709
 OD Sample 1 1/400 = 0.372
 OD Sample 1 1/800 = 0.242
 OD Sample 1 1/1600 = 0.164
- 2 Validation of the assay
 OD Control + = 2.130 (> 1.5) OK
 OD Control - = 0.102 (< 0.3) OK
- 3). Cut off calculation
 Positive cut off = 0.105 + 0.2 = 0.305
 Negative cut off = 0.105 + 0.1 = 0.205
- 4). Interpretation
 Sample 1: Positive (0.709)
 Titer Sample 1 : 1/400 (0.372)

IX. ONE WELL TITRATION:

Titre of positive samples will be obtained applying the following formula:

$$\text{TITRE (Y)} = 156 (e^{3,6x})$$

Where **e** is the natural logarithm base (2.718282); **x** is the sample's OD expressed as the relationship S/P (sample's OD / Positive control OD)

EXAMPLE:

3. Results of the assay:

Mean of Positive control OD = 2.130
 Mean of Negative control OD = 0.105
 Mean of OD for Sample 1 at dilution 1/200 = 0.709
 S/P = 0,709/2,130 = 0,333

4. Interpretation:

Sample 1 is positive because the OD at dilution 1/200 is higher than the positive cut off. (see example of point VIII)
 The titre of the sample is:

$$\text{TITRE (Y)} = 156 (e^{3,6*0,333}) = 517$$

Desarrollado y fabricado en España por:
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



Distributed in _____ by: