



INGEZIM PPA COMPAC

Prod Ref: 11.PPA.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo
para la detección de anticuerpos
específicos frente al virus de la Peste
Porcina Africana (VPPA)
en suero de cerdo

Blocking immunoenzymatic assay for
detection of antibodies to African Swine
Fever virus (ASFV) in porcine serum.

Ultima revisión / Last revision: 18-12-18
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 335 RD

Version 18-12-18:

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

COMPOSICION DEL KIT
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 8x12 pocillos 96 Well microtitration coated plates (divided in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo inactivado Vials with inactivated positive control serum	1	1 ml	2	1 ml
Viales de suero Control Negativo Vials with negative control serum	1	1 ml	2	1 ml
Viales de Conjugado (100x concentrado) Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	350 µl	2	350 µl
Fascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Diluyente de conjugado (DE01-1) (a la dilución de uso) Bottles with conjugate diluent (DE01-1) ready to use	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Diluyente de suero (DE31-1) (a la dilución de uso) Bottles with serum diluent (DE31-1) ready to use	1	60ml	1	60ml
Fascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 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.
Micropipets 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

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de bloqueo (**ELISA de bloqueo**), que se describe brevemente a continuación:

La placa de poliestireno lleva fijado el antígeno (vp72 del virus de la PPA). Se dispensan los sueros problema y los sueros control en los pocillos y después de un paso de lavado, un anticuerpo monoclonal (previamente marcado con peroxidasa) específico frente a la proteína vp72. En el caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al virus, estos se unirán a él imposibilitando la unión del monoclonal, mientras que si el suero problema carece de dichos anticuerpos, será el monoclonal el que se una al antígeno fijado en la placa.

Tras eliminar todo el material no adherido a la placa mediante sucesivos pasos de lavado, podremos revelar la presencia o ausencia de monoclonal marcado añadiendo el sustrato adecuado, que en presencia de peroxidasa dará lugar a una reacción colorimétrica medible. De esta forma, la presencia de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente al virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos.

El antígeno adsorbido a la placa se trata en este caso de un extracto purificado de la proteína estructural VP72 del virus de la PPA (proteína estructural mayoritaria del virus y la de mayor poder antigénico).

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, ni componentes de distintos lotes.
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. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION 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.

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. 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 infecciosos.

- 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 LAS MUESTRAS:

Las muestras deben ser sueros porcinos (**no usar muestras muy hemolizadas o contaminadas; pueden dar falsos resultados positivos**). Para su uso en el kit, deberán diluirse ½ en el diluyente de suero (DE31) proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50µl de diluyente y 50µl de muestra.

VI. PREPARACION 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 de concentrado +960 ml de H₂O_d). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

• **Sueros Control (+) y (-):**

Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir para su ensayo deberá realizarse la dilución 1/2 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 µl de diluyente y 50 µl de suero. Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante 1 mes entre +2°C y +8°C. Si se requiere alargar

estos periodos, recomendamos distribuirlos en alícuotas y almacenarlos hasta su uso a -20°C.

• **Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización.**

Realizar una dilución 1/100 en diluyente de conjugado (DE01) suministrado:

→ Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 10 µl de conjugado concentrado en 1 ml de diluyente de conjugado.

→ Para una placa completa recomendamos diluir 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente de conjugado.

Agitar bien antes de su uso.

Preparar únicamente el volumen estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Si se realiza la dilución en el mismo pocillo, añadir en primer lugar 50 µl de diluyente de suero y a continuación 50 µl de las muestras y controles. De este modo obtendremos una dilución de los sueros 1/2. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la mezcla, teniendo precaución de que no se produzca trasvase de unos pocillos a otros. Se recomienda ensayar controles por duplicado. **Sellar la placa e incubar 1 hora a 36±1°C o durante toda la noche (16-20 horas) a 20-25°C.**
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir en cada pocillo 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores. Sellar la placa e **incubar 30 min. a 36±1°C.**
5. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de 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 (20-25°C).
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Validación del test:

Para que el test se considere válido, ha de cumplirse que el valor de DO media de los pocillos de control negativo sea al menos 4 veces el valor de DO media de los pocillos del suero control positivo:

$$\frac{\text{DO Control Negativo}}{\text{DO Control Positivo}} \geq 4$$

Interpretación de resultados:

Si se están analizando las muestras por duplicado, se tomarán como valor de DO, la media de los valores obtenidos en ambos pocillos.

Los puntos de corte positivo y negativo se calculan del siguiente modo:

Punto de corte Positivo = CN - [(CN-CP) x 0.5]

Punto de corte Negativo = CN - [(CN-CP) x 0.4]

Donde: CN = DO Control Negativo
CP = DO Control Positivo

- ♦ Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten valores de DO inferiores o iguales al punto de corte positivo.
- ♦ Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten una absorbancia superior o igual al punto de corte negativo.
- ♦ Aquellas muestras cuyos valores de absorbancia se sitúen entre ambos puntos de corte, serán consideradas dudosas. En estos casos se recomienda retestar una nueva muestra de suero o proceder a ensayarla mediante otra técnica de análisis (IFI, ELISA Indirecto, etc...).

Si se desea calcular el porcentaje de bloqueo (**X %**) se procederá del siguiente modo: (≥ 50% positiva; ≤ 40% negativa; entre ambos valores dudosa)

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

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (Blocking Elisa). We make a brief description of the technique below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the serum sample does not contain specific antibodies they will not bind the antigen. If we add a specific monoclonal antibody (Mab) against the viral antigen coated to the plate (conjugated with peroxidase), it will compete with the antibodies of the serum. If the serum samples contains specific antibodies, they will

not allow the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the Mab will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material from the plate, we can detect the presence or absence of labelled Mab by adding the specific substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

The antigen coated to the plate in our kit consists of a purified protein extract from the virus (the VP72), which is the major structural protein from the ASFV and the most antigenic one.

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, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.
10. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

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

Once opened, control sera are stable for one month between +2°C and +8°C. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them under -20°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 SAMPLE

Samples to be used in the assay must be porcine sera. **Do not use highly haemolysed or contaminated samples. You might obtain false positive results.**

To be assayed a ½ dilution must be done in the supplied serum diluent (DE31).

This dilution could be done directly on the plate by adding 50µl of serum diluent and 50 µl of sera into each well.

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 (i.e. 40 ml of concentrate plus 960 ml of dH2O). When ready this solution remains stable between +2°C and +8°C until the expire date described at the label of the concentrated solution.

• **Control sera:**

Once opened, control sera are stable for one month between +2°C and +8°C. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them under-20°C.

The control sera need to be diluted ½ in diluent prior to be used, in the same way than the sera samples (you can do the dilution directly into the plate by adding 50 µl of diluent plus 50 µl of control sera).

• **Preparation of the conjugate: to make immediately before use.**

Dilute the needed quantity of conjugate provided in the kit 1/100 into the supplied conjugate diluent (DE01) (e.g. 110µl of conjugate into 11 ml of conjugate diluent is enough quantity for one plate).

Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature (20-25°C) before use.
2. Add 50 µl of supplied serum diluent to each well. Add 50 µl of positive control sera to two wells (e.g. A1 and B1), and 50 µl of the negative control sera (e.g. A2 and B2). Add 50 µl of sera samples to test on each remainder wells. We recommend the use of two wells for each control. Seal the plate and **incubate for 1 h±5min at 36±1°C or overnight (16-20 hours) at 20-25°C.**
3. Empty the wells into a container with NaOH solution and wash 4 times as specified in point IV.
4. Add 100 µl of specific conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at 36±1°C.**
5. Wash 5 times as previously described
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for 15 min at room temperature (20-25°C).
7. Add 100 µl of stop solution, to each well.
8. Read the OD of each well at 450nm 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 Negative Control (NC) is, at least ,4 times higher than the OD of the Positive Control (PC):

$$NC / PC \geq 4$$

Interpretation:

A. - Cut off calculation:

$$\text{Positive Cut Off} = NC - [(NC - PC) \times 0.5]$$

$$\text{Negative Cut Off} = NC - [(NC - PC) \times 0.4]$$

Where: NC = OD of Negative Control Serum
PC = OD of Positive Control Sera.

For calculating the blocking % (x %) of a sample:

$$X\% = \frac{NC - \text{SAMPLE OD}}{NC - PC} \times 100$$

≥ 50% positive

≤ 40% negative

Between both values, doubtful

B. - Results Interpretation:

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

- Serum samples with an OD lower than Positive Cut Off, are considered as POSITIVES to ASFV antibodies.
- Serum samples with an OD higher than Negative Cut Off, will be considered NEGATIVE to ASFV antibodies.
- Serum samples with OD values between both cut off are considered as doubtful. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this serum (IFI, Indirect ELISA, etc.).

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:

