

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



## INGEZIM PPV DAS

Prod Ref: 11.PPV.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo, para la detección de antígeno de parvovirus porcino en muestras biológicas

Enzymatic immunoassay for the detection of Porcine Parvovirus in biological samples.

Última revisión / Last revision: 24-06-15

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (1x8x12 pocillo) 1 plate box (1x8x12 well)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos 96 Well microtitration coated plates (divided in 12 strips of 8 wells each)	1	-
Viales de Control Positivo inactivado Vials with inactivated positive control	1	75 µl
Viales de Control Negativo inactivado Vials with inactivated negative control	1	75 µl
Viales de Conjugado I (AcM-biotina) (100x concentrado) Vials with biotin conjugate I (100x concentrated)	1	200 µl
Viales de Conjugado II (Streptavidina- peroxidasa) (100x concentrado) Vials with peroxidasa conjugate II 100x concentrated	1	200 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente DE01-01 (a la dilución de uso) Bottles with diluent DE01-01 (ready to use)	2	125 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) Bottles with Substrate (ABTS)	1	30 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	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)  
Stomacher o mortero manual  
Centrífuga

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 (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 *PPV*. Cuando sobre los pocillos de dicha placa, se depositan las muestras, en el caso de que exista presencia de antígeno de *PPV*, este será capturado por los anticuerpos inmovilizados en la placa. Tras lavar para eliminar el material no capturado, se añade un conjugado específico

(anticuerpo monoclonal específico frente a *PPV*, marcado con biotina), capaz de reconocer al antígeno que ha quedado capturado, en el caso de que exista. Para revelar y amplificar la presencia o no de conjugado unido, se añade un segundo conjugado (streptavidina-peroxidasa) que se unirá a la biotina presente. Tras añadir el sustrato adecuado (ABTS), ocurrirá una reacción coloreada medible en todos aquellos pocillos en los que exista peroxidasa, es decir en aquellos en los que la muestra contuviera antígeno específico de *PPV*.

Gracias a la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo, los resultados obtenidos con la aplicación de este kit son 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. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado conservada en refrigeración, podría precipitar. Asegurarse de que antes de su utilización, desaparece la precipitación después de mantenerla unos minutos a temperatura ambiente.

## III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +29°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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que las muestras 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. PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

### • **Solución de lavado:**

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada.

### • **Control (+) y (-):**

Realizar una dilución 1/100 del contenido de los viales de control positivo y negativo (5µl de control hasta 0.5 ml de diluyente).

## INGEZIM PPV DAS 11.PPV.K2

- **Preparación de los conjugados I y II: A realizar inmediatamente antes de su utilización.**

Realizar de forma independiente, para cada uno de los conjugados, una dilución 1/100 en diluyente suministrado:

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

- Para una placa completa recomendamos diluir 110 µl de conjugado hasta 11 ml de diluyente.

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

- **Preparación de sustrato El susstrato se suministra listo para su uso.**

## VI. PREPARACION DELAS MUESTRAS

Se homogeniza 1 g de la muestra en 10 ml del diluyente suministrado, centrifugándose a continuación a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido, será utilizado como muestra en el ensayo.

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de control positivo (preparado según procedimiento anterior) en el primer pocillo, 100 µl de control negativo en el segundo pocillo. Dispensar 100 µl de cada una de las muestras en los pocillos restantes. Es recomendable testar las muestras y los controles por duplicado. Tapar la placa e **incubar 1 hora a 37°C**.
3. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0,1M y lavar 4 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de Conjugado I (AcM-biotina), preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 1 hora a 37°C**.
5. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0,1M y lavar 4 veces según procedimiento descrito.
6. Añadir 100 µl de Conjugado II (streptavidina-peroxidasa), preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 30 minutos a temperatura ambiente (25°C)**.
7. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
8. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción **durante 10 minutos a temperatura ambiente**.
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
10. 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 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

### Validación del test:

El ensayo se considerará válido siempre que se cumpla la siguiente relación:

$$\frac{\text{D.O. Control (+)}}{\text{D.O. Control (-)}} > 5$$

### Interpretación de resultados:

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

El punto de corte (cut off) positivo/negativo, se calcula como el 20% del valor de D.O. del control positivo:

$$\text{Cut off} = 0.2 \times \text{D.O. Control (+)}$$

Si la muestra presenta un valor de D.O. superior al valor del punto de corte, será considerada como positiva. Si, por el contrario, la muestra presenta un valor inferior al punto de corte, se considerará negativa.

## I. TECHNICAL BASIS

The kit is based on a Double antibody sandwich enzymatic immunoassay (DAS or capture Elisa). This technique has great advantages over other techniques which have been used traditionally: higher sensitivity and specificity rates, faster and easily automatable. The technique is briefly described below:

A specific monoclonal antibody (Mab) against PPV is fixed on a solid support (polystyrene plate). When a sample containing viral antigen is added, the viral particles will bond to the Mab. After washing the plate to remove all non-fixed material, we add a specific conjugate: a biotinylated monoclonal antibody to PPV.

In presence of the viral antigen this Mab will bind to it. After a second washing step, we add a second conjugate (Streptavidin-peroxidase) that will bind only to the biotin present in each well in the case the antigen had been previously bound. We can demonstrate the presence of this second conjugate by adding a chromogen substrate which, in presence of the peroxidase, will produce a colorimetric reaction.

The use of these very specific and stable Mabs guarantees the objectivity, specificity, safety and accuracy of the assay.

## 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 reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. The substrate and the substrate buffer must be handled with care.
10. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
11. The stop solution may precipitate between +2°C and +8°C. When it happens, warm it up at 37°C before use.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

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

## IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps can be done using an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.

- Repeat the process as many times as indicated in the kit instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

### **ATTENTION!**

**You are working with biological material that could contain infectious agents. All rejected material needs to be sterilised. We recommend using a recipient containing NaOH to throw away the liquids after washing the plate.**

## V. PREPARATION OF REAGENTS

---

- **Washing solution:**

Dilute one part of the 25x concentrated washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water. Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.

- **Preparation of the conjugates I and II: to be prepared immediately before use.**

For each conjugate do the preparation process separately. Dilute the required volume of conjugate 1/100 with the diluent provided in the kit:

➤ The necessary and sufficient amount of conjugate for a complete plate is 110 µl of conjugate with 11 ml of diluent.

➤ The necessary and sufficient amount of conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate with 1 ml of diluent.

Shake the solution well before use.

Prepare only the amount of conjugate necessary to run the test, as the remaining solution must be discarded.

- **Positive and Negative controls:**

Prepare a 1/100 dilution of the controls with the diluent provided in the kit. (5 µl of control with 500 µl with diluent).

- **Substrate: It is supplied ready to use**

## VI. PREPARATION OF SAMPLES:

---

Macerate 1 gr. of tissue sample in 10 ml of diluent. After a good homogenisation of the sample, centrifuge the homogenate at 1500 r.p.m. for 10 min.

The supernatant obtained will be used as the assay sample.

## VII. TEST PROCEDURE

---

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C) (except conjugate).
2. Add 100 µl of the positive control and 100 µl of the negative control (diluted as specified above) to two wells of the plate (each control must be assayed in duplicate). Add 100 µl of each sample to be tested to the remaining wells. We recommend running samples also in duplicate. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
3. Throw away the liquid contained in the plate on a recipient containing NaOH, and wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate I (biotin conjugate), diluted as specified before, to each well. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
5. Wash 4 times following the procedure previously described.
6. Add 100 µl of conjugate II (Streptavidin-peroxidase) prepared following previous instructions to each well. Seal the plate and **incubate 30 minutes at room temperature (25°C)**.
7. Wash 5 times more following the procedure previously described.
8. Add 100 µl of the substrate to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**.
9. Add 100 µl of the stop solution to each well. We recommend adding this reagent following the same order in which the substrate was added.
10. Read the OD of each well at 405 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be made with a spectrophotometer at **405 nm**.

### **Validation of the Test:**

To validate the assay, the ratio OD (Positive Control) / OD (Negative Control) must be higher than 5.

### **Cut-off Calculation:**

The Cut-off value must be calculated as the 20% of the OD value obtained with the positive control assayed:

$$\text{Cut-off} = 0,2 \times \text{OD (Positive Control)}$$

### **Interpretation of the Results:**

When running the test in duplicate, the OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of the OD values in both wells.

- ⇒ All samples with OD values higher than the cut off value, must be considered as positive
- ⇒ All samples with OD values lower than the cut off value, must be considered as negative

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 91.368.05.01/04  
Fax: +34 91 408.75.98  
E-mail: [ingenasa@ingenasa.com](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)



Distributed in by: