



INGEZIM PPV COMPAC

Prod Ref: 11.PPV.K3

Ensayo inmunoenzimático para la
detección de anticuerpos específicos de
parvovirus porcino en suero de cerdo

Enzyme immunoassay for detection of
antibodies against porcine parvovirus in
pig serum

Última revisión / Last review: 18-12-14



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 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 Vials with positive control serum	1	600 µl	2	600 µl
Viales de suero Control Negativo Vials with negative control	1	600 µl	2	600 µl
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	200 µl	2	200 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente listo para su uso Bottles with diluent ready to use	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) Bottles with Substrate	1	30 ml	1	65 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 TÉCNICO DEL KIT

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

Las placas se suministran antigenadas con rVLPs (Virus Like Particles, recombinantes) de PPV, obtenidas en células de insecto, utilizando el sistema de expresión de baculovirus.

Sobre los pocillos así antigenados, se dispensan tanto los sueros a ensayar como el conjugado específico del ensayo. Este conjugado es un anticuerpo monoclonal específico de PPV, marcado con peroxidasa. Cuando el suero problema, contiene anticuerpos frente al PPV, estos se unirán al

antígeno presente en el pocillo, impidiendo la unión al mismo del conjugado. Por el contrario, cuando el suero problema no contenga anticuerpos frente a PPV, el conjugado podrá unirse de forma específica al antígeno presente en el pocillo. Tras lavar la placa eliminando el material no adherido, se añade el sustrato (ABTS). Este reactivo en presencia de la enzima peroxidasa, producirá una reacción colorimétrica medible a 405 nm. De este modo, cuando la muestra no contenga anticuerpos frente a PPV, se desarrollará una reacción colorimétrica indicando que el conjugado ha podido unirse al antígeno y viceversa, cuando no aparezca color tras este paso del ensayo y nos indicará que el suero contenía anticuerpos y que por lo tanto ha bloqueado la unión del conjugado.

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. Para cada utilización del kit, preparar una solución de sustrato fresca.
11. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C. ATENCION: A esta temperatura la solución de frenado puede precipitar, si esto sucede, calentar a +37°C antes de utilizarla.

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:

- 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.
- 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.

V. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada. Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +20°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 1/5 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 80 µl de diluyente y 20 µl de suero. Los sueros controles, permanecerán estables durante periodos cortos, 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 suministrado:
 - Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 5 µl de conjugado concentrado en 500 µl de diluyente.
 - Para una placa completa recomendamos diluir 60 µl de conjugado en 6 ml de diluyente.
- Preparar únicamente el volumen estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.
- **Sustrato:**
Listo para usar.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Contando con incluir dos pocillos para cada uno de los sueros control y uno o dos pocillos por cada muestra problema, dispensar en cada pocillo de la placa a utilizar el volumen de 80 µl de diluyente suministrado. Dispensar en los pocillos reservados para los sueros controles 20 µl de suero y en el resto de los pocillos 20 µl de cada una de las muestras. De este modo obtendremos una dilución de los sueros 1/5. Sellar la placa **e incubar 30 minutos a 37°C**.
Si lo prefiere, esta dilución puede realizarla para cada suero en un tubo independiente y, después de homogenizar, dispensar el volumen de 100 µl en cada pocillo.
3. **Sin vaciar el contenido de la placa**, añadir 50 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Tras este paso, es importante que la placa sea agitada para garantizar la buena homogenización del contenido de cada pocillo. Sellar la placa **e incubar 30 minutos a 37°C**.
4. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
7. 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. INTERPRETACION DE RESULTADOS:

A) Validación del test:

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

$$\frac{\text{DO (Control Negativo)}}{\text{DO (Control Positivo)}} > 4$$

B) 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. Para cada muestra se calculará en porcentaje de competición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{DO (Control -)} - \text{DO(muestra)}}{\text{DO (CONTROL -)} - \text{DO (Control +)}} \times 100$$

- Si el porcentaje de competición es mayor al 30%, la muestra se considerara positiva para anticuerpos de PPV
- Si el porcentaje de competición es inferior al 25 % la muestra se considerara negativa para anticuerpos de PPV
- Si el porcentaje de competición se encuentra entre el 25 y el 30 % la muestra se considerara dudosa. En este caso se recomienda la repetición del análisis obteniendo una nueva muestra de suero del animal transcurridas dos o tres semanas.

I. TECHNICAL BASIS

The Kit has been designed to detect, in a very easy way, specific antibodies to PPV in porcine sera samples. This Kit is based on a blocking enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

The recombinant PPV antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). The serum sample is added to each well. After incubation, we add a specific monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to VP2 protein of the PPV. If the serum sample does not contain antibodies against the virus, the conjugate will bind to the plate, whereas if it contains specific antibodies

to PPV, 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 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 be handled with care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

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

Stop solution may precipitate at this temperature. When it happens, warm at 37°C before use.

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.

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 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 60 µl of Conjugate with 6 ml of diluent.
- ⇒ The necessary and sufficient quantity of Conjugate for an eight wells strip is 5 µl of conjugate with 500 µl 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:**

Control sera must be handle as samples by adding 20 µl of serum and 80 µl of diluent.

We recommend making aliquots and storing them at -20°C.

- **Substrate**

Ready to use.

VI. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 80 µl of diluent to all the wells to be used (including the ones for the positive and negative control serum).
3. Add 20 µl of Positive control serum, Negative control serum and samples to each well of the plate. For high accuracy it is recommended to run samples and controls in duplicate. Seal the plate and **incubate for 30 min at 37°C**.
4. Without removing the sera, add 50µl of conjugate, prepared as described above, to each well. Shake carefully the plate for a better homogenisation of the contents in the wells and **incubate 30 min at 37°C**.
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**.
7. Add 100 µl of stop solution to each well. It is recommended to add this reagent in the same order than was used for adding the substrate.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VII. READING AND RESULTS INTERPRETATION

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

A) Validation of the Test:

To validate the assay, the ratio OD (Negative Control) / OD (Positive control) must be higher than 4

B) Interpretation of the Results:

For each sample, the blocking % must be calculated by:

$$\frac{\text{OD (Neg. Control)} - \text{OD (sample)}}{\text{OD (Neg. Control)} - \text{OD (Pos. Control)}} \times 100$$

When you are running duplicate samples, OD values will be calculate for each sample as the arithmetic mean of both values.

- All samples with blocking % higher than 30%, must be considered as positives
- All samples with blocking % lower than 25%, must be considered as negatives
- Samples with blocking % between both values must be considered as doubtful. For these samples a new assay is recommended after 3 weeks.

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:

