



INGEZIM APP mix 10-12

Prod Ref: 11.APX.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente a los serotipos 10 y 12 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) en suero de cerdo

Immunoenzymatic assay for the detection of antibodies specific of serotypes 10 & 12 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) in porcine serum

Última revisión / Last revision: 19-6-13
2011-05-25
Nº registro: 3043-RD

COMPOSICION DEL KIT

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag de APP 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with Ag APP	2	-
Viales de suero Control Positivo APP 10 listo para su uso Vials APP 10 positive control serum ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Positivo APP 12 listo para su uso Vials APP 12 positive control serum ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	2,5 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa Concentrado 100x Vials with 100x concentrated peroxidase conjugate	1	300µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	100 ml
Frascos de Diluyente 10x concentrado Bottles with diluent 10x concentrated	1	100 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) listo para su uso Bottles with Substrate ready to use	1	24 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	24 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

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

Las muestras de suero se diluyen y se incuban en pocillos con antígeno de APP (diferente según la referencia). 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

cerdo mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras un segundo lavado para eliminar el exceso de conjugado, se añade el substrato cromógeno y 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 APP, mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

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 manipulan 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. Usar únicamente agua destilada para la reconstitución de los reactivos.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. Tanto el sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

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 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 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:

Se recomienda encarecidamente analizar las muestras por duplicado. Realizar la dilución 1/200 (4 µl de suero en 796µl de diluyente 1x) en el diluyente suministrado previamente diluido según se describe en el siguiente punto.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado :**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada. (p.e. 40 ml de concentrado más 960 ml de agua).

- **Diluyentes :**

Diluir una parte de la solución concentrada en 9 partes de H₂O destilada. Una vez preparado, la solución (1X) es estable durante 1 semana entre +2C y +8°C.

- **Sueros Controles (+) y (-) :**

Los sueros controles vienen listos para su uso

- **Preparación del conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización**

Realizar una **dilución 1/100 en diluyente** (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente, es la cantidad mínima necesaria por placa).

Agitar muy bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

- **Sustrato**

Esta listo para uso. No diluir

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras y controles:**
 - Hacer una representación esquemática de la placa y de la distribución de controles y muestra.
 - Dispensar 100µl de cada control positivo listo para su uso en dos pocillos.
 - Dispensar 100µl de control negativo listo para su uso en dos pocillos.
 - Dispensar 100µl de las muestras diluidas según el apartado V en el resto de pocillos. Se recomienda analizar las muestras por duplicado.
3. Tapar la placa e incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente (23±2°C)**.
3. Lavar 5 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo.
5. Tapar la placa e incubar **30 minutos a temperatura ambiente (23±2°C)**
6. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
7. Añadir 100 µl de solución sustrato, Mantener la reacción **20 minutos a temperatura ambiente (23±2°C) y en oscuridad**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado, por contener detergente, puede formar espumas. Evitar dispensar burbujas en la placa pues podría afectar a la lectura de los resultados.
9. Leer a 405 nm en un lector de Elisa. Si el lector está equipado con filtros de referencia, ajustarlo a 490nm. Leer antes de 15 minutos después de parar la reacción.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

1. CÁLCULO DE LAS RATIO

Calcular la media (m) de las DOs obtenidas para los controles de APP10 (mDO_{APP10}), de APP12 (mDO_{APP12}), para el Control negativo y para cada muestra (mDO_s). Después, calcular la media de las medias de los controles positivos (mDO_{APP10-12}). Obtener la ratio del Control Negativo (Ratio CN) y de cada muestra (Ratio M) dividiendo la media de la DO del Control negativo o de la muestra respectivamente por la media de la DO de los controles positivos (mDO_{APP10-12}):

$$\text{Ratio M} = \frac{\text{mDO}_s}{\text{mDO}_{\text{APP10-12}}}$$

$$\text{Ratio CN} = \frac{\text{mDO}_{\text{CN}}}{\text{mDO}_{\text{APP10-12}}}$$

Ejemplo:

- DO APP 10: 1.250 y 1.200 ; mDO_{APP10} = (1.250 + 1.200)/2 = 1.225
- OD APP 12: 1.100 y 1.200 ; mDO_{APP12} = (1.100 + 1.200)/2 = 1.150
 - o mDO_{APP10-12} = (1.225 + 1.150)/2 = 1.187
- mDO_s = 0.800 et 0.850 ; M OD S = (0.800 + 0.850)/2 = 0.825
- Ratio S = 0.825/1.187 = 0.695

2. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

- La Ratio del control negativo es < 0,15
- La media de cada una de las DO de los diferentes controles positivos es > 0,70

3. INTERPRETACIÓN

RATIO < 0,4: Muestra Negativa
 RATIO ≥ 0,6: Muestra Positiva
 Entre 0,4 y 0,60: Muestras sospechosas

I. TECHNICAL BASIS

This is an immunoenzymatic assay for the detection of antibodies against APP parasuis (HPS) in porcine serum.

The porcine serum samples and the controls are diluted and incubated in wells coated with APP antigens. The antibodies (Abs) specific to APP present in positive serum samples will bind to the Ags in the wells. After several washes to eliminate unbound substances, a conjugate (an Ab coupled to and

enzyme) targeted at the porcine Abs is added. After incubation, the excess of this conjugate is eliminated by a second wash and its attachment is revealed with a chromogenous substrate. Following this incubation, the enzyme, if present, reacts with the substrate and a green color develops. The reaction is stopped and the optical densities are read. The intensity of the colour allows the determination of the type of sample tested.

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 and stop solution must be handle whit care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored BETWEEN +2°C and +8°C. WARNING: Stop Solution may precipitate at this temperature, if it happens, warm up at +37°C before use.

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 SAMPLE

It is strongly recommended to test the samples and controls as duplicate.

Dilute porcine serum samples at 1/200 in 1X serum diluent (e.g., 4 µl sample in 796 µl 1x diluent). Make sure you use a new tip for each sample. Also make sure each dilution is properly mixed before being distributed into the wells.

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 with 960 ml of water).

• **Preparation of Diluent:**

Supplied diluent is 10x concentrated. Before using it, a 1/10 dilution must be done with distilled or deionized water (1 vol. of concentrated supplied Diluent with 9 volume of distilled water). When ready this solution remains stable at +4°

• **Control sera:**

Controls are supplied ready to use. Do not dilute

Preparation of the conjugate: to make immediately before use.

Dilute the needed quantity of conjugate provided in the kit 1/100 in diluent:

The necessary and sufficient quantity for a complete plate is 110 µl of conjugate with 10,9 ml of diluent. Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

• **Preparation of the substrate solution.**

Substrate is supplied ready to use.

VII. TEST PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature and mix well manually before use. For each plate used:

1. Make a schematic representation of the plate and the distribution of controls and samples.
2. Dispense 100 µL of each of the ready-to-use positive controls APP 10 and APP 12 into two wells.
3. Dispense 100 µL ready-to-use negative control into two wells.
4. Dispense 100 µL diluted samples (see section V) into two wells.
5. Incubate at 23 ± 2°C for 30 minutes.
6. Wash each well 5 times with 300 µL 1X wash solution (see section IV). Throw away all liquid contained in the plate after each wash. After the last wash, dry the plate by tapping it on absorbent paper.

7. Dispense 100 µL diluted conjugate (see section VI) into each well.
8. Incubate at 23 ± 2°C for 30 minutes.
9. Repeat step 6.
10. Dispense 100 µL ready-to-use substrate into each well.
11. Incubate, away from light, at 23 ± 2°C for 20 minutes.
12. Dispense 100 µL ready-to-use stop solution into each well.
13. Measure optical densities (OD) at 405 nm. If the microplate reader is equipped with a reference filter, set it at 490 nm. The reading should be done no later than 15 minutes after the addition of the stop solution.
14. Calculate the results.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

1. Calculation of the Ratio

Calculate the mean (M) of ODs obtained for the APP 10 positive control (M OD_{APP 10}), the APP 12 positive control (M OD_{APP 12}), the negative control and each sample (M OD_s). Then, calculate the mean of the means of the positive controls (MOD_{APP10-12}). To obtain ratio Negative Control (Ratio NC) or ratio of sample (Ratio S), divide Negative Control mean OD or each sample's mean OD respectively by the mean of the means of the positive controls (M OD_{APP10-12}).

$$\text{Ratio S} = \frac{mDO_s}{mDO_{\text{APP10-12}}}$$

$$\text{Ratio NC} = \frac{mDO_{\text{NC}}}{mDO_{\text{APP10-12}}}$$

Example

- OD_{APP10}: 1.250 & 1.200; M OD_{APP10} = (1.250 + 1.200)/2 = 1.225
- OD_{APP12}: 1.100 & 1.200; M OD_{APP 12} = (1.100 + 1.200)/2 = 1.150
- M OD_{APP 10-12} = (1.225 + 1.150)/2 = 1.187
- OD_s = 0.800 & 0.850; M OD_s = (0.800 + 0.850)/2 = 0.825
- Ratio S = 0.825/1.187 = 0.695

2. Validity Criteria

The following criteria must be met in order to validate the analysis:

- Negative control ratio must be less than 0.15.
- Mean of each of the different positive controls ODs must be greater than 0.70.

3. Interpretation

	APP 10-12
negative	ratio < 0.40
suspect	0.40 ≤ ratio < 0.60
positive	ratio ≥ 0.60

Desarrollado y producido por:
Developed and manufactured by:

Biovet[®]

Empaquetado y distribuido en España por:
Packaged and distributed 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.es
www.ingenasa.es

