



INGEZIM APP mix

Prod Ref: 11.APP.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) 1-2-9-11, 3-6-8-15 y 4-5-7 en suero de cerdo

Immunoenzymatic assay for the detection of antibodies specific of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) 1-2-9-11, 3-6-8-15 and 4-5-7 in porcine serum

Última revisión Last review: 17-6-13

2011-05-25

Nº REGISTRO 3042

COMPOSICION DEL KIT

Reactivo Reagent	6 placas (2x8x12 pocillos) 6 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag de APP 1-2-9-11 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with Ag APP 1-2-9-11	2	-
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag de APP 4-5-7 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with Ag APP 4-5-7	2	-
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag de APP 3-6-8-15 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with Ag APP 3-6-8-15	2	-
Viales de suero Control Positivo 5 listo para su uso Vials positive control serum 5 ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Positivo 1-9-11 listo para su uso Vials positive control serum 1-9-11 ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Positivo2 listo para su uso Vials positive control serum 2 ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Positivo 4-7 listo para su uso Vials positive control serum 4-7 ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Positivo 3-6-8-15 listo para su uso Vials positive control serum 3-6-8-15 ready to use	1	2,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	7,5 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa Concentrado 100x Vials with 100x concentrated peroxidase conjugate	1	0,75ml
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	2	250 ml
Frascos de Diluyente 10x concentrado Bottles with diluent 10x concentrated	4	100 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) listo para su uso Bottles with Substrate ready to use	1	70 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	70 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 and +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 y controles 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 :**

La solución de lavado está 25x concentrada. Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada. (p.e. 40 ml de concentrado más 960 ml de agua).

• **Diluyentes :**

El diluyente está 10x concentrado. 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 +2°C 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 usar en dos pocillos:
 - o Para las placas APP 1-2-9-11, usar los controles positivos APP1-9-11 y APP2.
 - o Para las placas APP 3-6-8-15, usar el control positivo 3-6-8-15.
 - o Para las placas APP 4-5-7, usar los controles APP 4-7 y APP 5
 - Dispensar 100µl de control negativo listo para su uso en dos pocillos de cada placa.
 - Dispensar 100µl de las muestras diluidas en los pocillos de cada una de las placas APP1-2-9-11, APP 3-6-8-15 y APP 4-5-7. 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 en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado. 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 DEL ÍNDICE DE POSITIVIDAD****PLACAS APP 1, 2, 9 y 11:**

Calcular la media (M) de DO obtenida para el control positivo APP 1-9-11 (M DO APP1-9-11), la media para el control positivo APP2 (M DO APP 2), la media para el control negativo y la media de las muestras (M DOm) Después, calcular la media de las medias de los controles positivos (M DO APP 1-9-11-2).

Para obtener el índice de positividad de cada muestra, dividir la media de la DO de la muestra por la media de la DO de los controles positivos (P):

$$\text{INDICE de positividad M} = \frac{M \text{ DO}_m}{M \text{ DO APP 1-9-11-2}}$$

- DO APP 1-9-11 : 1.250 y 1.200 ; M DO APP 1-9-11 = $(1.250 + 1.200)/2 = 1.225$
- DO APP 2 : 1.100 et 1.200 ; M DO APP 2 = $(1.100 + 1.200)/2 = 1.150$
- M DO APP 1-9-11-2 = $(1.225 + 1.150)/2 = 1.187$
- DO m = 0.800 et 0.850 ; M DO m = $(0.800 + 0.850)/2 = 0.825$
- Índice de positividad M = $0.825/1.187 = 0.695$

PLACAS APP 4-5-7:

Proceder como para las placas APP 1-2-9-11

PLACAS APP 3-6-8-15:

Calcular la media (M) de DO obtenida para el control positivo APP 3-6-8-15 (M DO APP 3-6-8-15), la media para el control negativo y la media de las muestras (M DOm)

Después, calcular la media de las medias de los controles positivos (M DO APP 3-6-8-15).

2. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

- El índice del control negativo es $< 0,15$
- La media de DO de los diferentes controles positivos es $> 0,70$

3. INTERPRETACIÓN**PLACAS APP 1-2-9-11**

- INDICE $< 0,33$: Muestra Negativa
- INDICE $\geq 0,5$: Muestra Positiva
- $0,33 \leq \text{índice} < 0,5$: Muestras sospechosas

PLACAS APP 3-6-8-15

- INDICE $< 0,3$: Muestra Negativa
- INDICE $\geq 0,5$: Muestra Positiva
- $0,30 \leq \text{índice} < 0,5$: Muestras sospechosas

PLACAS APP 4-5-7

- INDICE $< 0,35$: Muestra Negativa
- INDICE $\geq 0,5$: Muestra Positiva
- $0,35 \leq \text{índice} < 0,5$: Muestras sospechosas

En caso de muestras dudosas o positivas, se recomienda analizarlas frente a los serotipos correspondientes utilizando los kits específicos de esos serotipos (Swinecheck® APP 1-9-11, APP 2, APP 3-6-8, APP 4-7, APP 5).

I. TECHNICAL BASIS

This is an immunoenzymatic assay for the detection of antibodies against APP parasuis 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 an 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 handled.
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 handled with 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 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

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.

1. Make a schematic representation of the plate and the distribution of controls and samples.
2. Dispense 100 µL of each ready-to-use positive control into two wells:
 - For APP 1-2-9-11 plates, use controls APP 1-9-11 and APP 2
 - For APP 3-6-8-15 plates, use control APP 3-6-8-15
 - For APP 4-5-7 plates, use controls APP 4-7 and APP 5
3. Dispense 100 µL ready-to-use negative control into two wells of each of the plates.
4. Dispense 100 µL diluted samples (see section B) into two wells of each of the plates APP 1-2-9-11, APP 3-6-8-15, APP 4-5-7.
5. Incubate at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 minutes.
6. Wash each well 5 times with 300 µL 1X wash solution (see section A). Throw away all liquid

7. Dispense 100 µL diluted conjugate (see section C) into each well.
8. Incubate at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 minutes.
9. Repeat step 6.
10. Dispense 100 µL ready-to-use substrate into each well.
11. Incubate, away from light, at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 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

APP 1-2-9-11

Calculate the mean (M) of ODs obtained for the APP 1-9-11 positive control (M OD APP 1-9-11), the APP 2 positive control (M ODAPP 2), the negative control and each sample (M ODS). Then, calculate the mean of the means of the positive controls (M ODAPP 1-9-11-2). To obtain ratio, divide each sample's mean OD by the mean of the means of the positive controls (M OD APP 1-9-11-2).

Example

- OD APP 1-9-11 : 1.250 et 1.200 ; M ODAPP 1-9-11 = $(1.250 + 1.200)/2 = 1.225$
- OD APP 2 : 1.100 et 1.200 ; M OD APP 2 = $(1.100 + 1.200)/2 = 1.150$
- o M OD APP 1-9-11-2 = $(1.225 + 1.150)/2 = 1.187$
- OD S = 0.800 et 0.850 ; M OD S = $(0.800 + 0.850)/2 = 0.825$
- Ratio S = $0.825/1.187 = 0.695$

APP 4-5-7

Proceed as for plates APP 1-2-9-11

APP 3-6-8-15

Calculate the mean (M) of ODs obtained for the APP 3-6-8-15 positive control (M OD 3-6-8-15), the negative control and each sample (M ODS). To obtain ratio, divide each sample's mean OD by the mean value of the positive control (M OD APP 3-6-8-15).

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

PLATES APP 1-2-9-11

- RATIO < 0.33: Negative sample
- RATIO \geq 0.5: Positive sample
- $0.33 \leq$ ratio < 0.5: Suspicious samples

PLATES APP 3-6-8-15

- RATIO < 0.30: Negative sample
- RATIO \geq 0.5: Positive sample
- $0.30 \leq$ ratio < 0.5: Suspicious samples

PLATES APP 4-5-7

- RATIO < 0.35: Negative sample
- RATIO \geq 0.5: Positive sample
- $0.35 \leq$ ratio < 0.5: Suspicious samples

In case of suspect or positive result, it is recommended to test the samples against the relevant serotypes using kits specific for these serotypes (ie. Swinecheck® APP 1-9-11, APP 2, APP 3-6-8, APP 4-7, APP 5).

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)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

