



INgezim® PPA Compac 2.0

Prod Ref: 11.ASF.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) en suero porcino (cerdo doméstico, jabalí, etc).

Blocking immunoenzymatic assay for detection of antibodies to African Swine Fever virus (ASFV) in porcine serum (domestic pigs, wild boar, etc.).

Version Doc:22.07.2024

Nº de registro en España: 12599-RD

Registration number in Spain: 12599-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de ELISA antigenadas	2		5	
Viales de Control Positivo	1	1mL	2	1mL
Viales de Control Negativo	1	1mL	2	1mL
Frascos contenidos Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30 ml	2	30 ml
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE31-01), listo para usar	1	60mL	1	60mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Agua destilada o desionizada.

Micropipetas.

Puntas de micropipeta de un solo uso.

Dispositivos para lavado de placas.

Probetas.

Lector ELISA (filtro de 450 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

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

Los pocillos de la placa llevan fijado el antígeno diana, la vp72 del virus de la Peste porcina africana, proteína estructural mayoritaria y de gran poder antigénico del virus. Sobre ellos, se dispensan los sueros a testar y, después de un paso de lavado, un anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína vp72 marcado con peroxidasa. En caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al vPPA, éstos se unirán a la proteína fijada en la placa imposibilitando la unión del anticuerpo monoclonal. Si el suero problema carece de dichos anticuerpos, será el anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa 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, la presencia de anticuerpo monoclonal unido se evidencia mediante la adición del sustrato cromogénico que adquiere un color azul medible en presencia de peroxidasa. De esta forma, la aparición de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente al virus en el suero ensayado y la ausencia de color indicará la presencia de anticuerpos en el suero.

PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
8. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN 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 a -20°C.

INFORMACIÓN 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 NaOH 0,1M, ya que las muestras problema podrían 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 boca abajo la placa sobre un papel de filtro absorbente para eliminar toda la solución de lavado.

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 1/2 en el diluyente de suero (DE31) proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50 µL de diluyente y 50 µL de muestra.

PREPARACIÓN 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). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C hasta la fecha de caducidad descrita en la etiqueta del frasco de solución concentrada.

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.

PROCEDIMIENTO

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (20°C - 25°C).
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 los controles por duplicado. **Sellar la placa e incubar 1 hora a 36 ± 1°C o durante toda la noche* (16-20 horas) entre + 4°C y + 25°C.**
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir en cada pocillo 100 µL del conjugado suministrado en el kit. 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.**
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 densidad óptica a 450 nm de cada pocillo en un lector de ELISA en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

* La incubación durante toda la noche muestra una sensibilidad superior al protocolo de 1 h en muestras con bajo título de anticuerpos.

LECTURA E INTERPRETACIÓN 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.

Punto de corte en base a densidad óptica;

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

- Punto de corte Positivo = $CN - [(CN - CP) \times 0,5]$
- Punto de corte Negativo = $CN - [(CN - CP) \times 0,4]$

Dónde:

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 analizar una nueva muestra de suero o proceder a ensayarla mediante otra técnica de análisis (IFI, ELISA Indirecto, etc.).

Punto de corte en base a porcentaje de bloqueo;

Si se desea calcular el porcentaje de bloqueo (X %) se procederá del siguiente modo:

$$X \% = \frac{CN - DO (\text{muestra})}{CN - CP} \times 100$$

El punto de corte en base al porcentaje de bloqueo se establecerá de la siguiente manera:

- Muestras POSITIVAS, $X\% \geq 50\%$
- Muestras NEGATIVAS, $X\% \leq 40\%$
- Muestras DUDOSAS, $40\% < X\% < 50\%$. En estos casos se recomienda analizar una nueva muestra de suero o proceder a ensayarla mediante otra técnica de análisis (IFI, ELISA Indirecto, etc.).

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials with Positive Control	1	1mL	2	1mL
Vials with Negative Control	1	1mL	2	1mL
Bottles with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Diluent (DE31-01), ready to use	1	60mL	1	60mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Distilled or deionized water.
Micropipettes.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes.
ELISA Reader (450 nm filter).

TECHNICAL BASIS

This kit is based on the blocking enzymatic immunoassay technique (**Blocking ELISA**), briefly described below:

The plate wells were previously sensitized with the target antigen, the vp72 of the African swine fever virus, the major structural protein of the virus with high antigenic capability. The sera to be tested are added to the wells and, after a washing step, a specific monoclonal antibody to the vp72 protein labelled with peroxidase is added. When a serum sample contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on the plate, blocking the binding of the monoclonal antibody. If the serum sample does not contain specific antibodies, the monoclonal antibody labelled with peroxidase will be the one that binds to the coated antigen.

Non-fixed material is eliminated from the plate by several washing steps. Afterwards, the presence of bound monoclonal antibody is visualized by the addition of the chromogenic substrate, which acquires a measurable blue color in the presence of peroxidase. In this way, the appearance of color in the well indicates the absence of specific antibodies to the virus in the assayed serum, while the absence of color indicates the presence of specific antibodies.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions for use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. Do not eat, drink, or smoke while specimens or kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used from the bottle and to never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C.

Control sera are stable for one month. In case they are not going to be used in this period, we recommend storing them in aliquots at -20°C.

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 tightly overturning the plate to avoid the possible mixture of different wells content. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
- Dispense a volume of 300 µL of washing solution on each well.
- Softly mix the plate, avoiding the contamination between wells.
- Turn over the plate abruptly to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated on the instructions of the kit. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not keep the plate dry.
- After the last washing step, shake it upside down on an absorbent filter paper to eliminate all washing buffer.

PREPARATION OF SAMPLES

Samples to be used in the assay must be porcine sera. **Do not use highly hemolyzed or contaminated samples. You might obtain false positive results.** Samples has to be assayed at a 1/2 dilution in the supplied serum diluent (DE31).

This dilution could be done directly in the plate by adding 50 µL of serum diluent and 50 µL of serum into each well.

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:

The control sera has to be treated as test samples, diluted 1/2 in diluent prior to be used. This dilution can be done directly in the plate by adding 50 µL of diluent plus 50 µL of control sera. Once opened, control sera are stable for one month between +2°C and +8°C. In case they are not going to be used in this period, we recommend storing them in aliquots at -20°C.

TEST PROCEDURE

1. Before performing the assay, let all kit components reach room temperature (20°C to 25°C).
2. If dilution is directly prepared in the plate, add first 50 µL of the supplied serum diluent to each well. Then, add 50 µL of control sera and of the samples to be tested. Softly shake the plate for an appropriate homogenization of the samples, careful to avoid liquid transfer between wells. It is recommended to include control sera in duplicate for each assay. Seal the plate and **incubate for 1 h ± 5 min at 36 ± 1°C or overnight* (16-20 hours) at +4°C to + 8°C.**
3. Empty the wells into a container with NaOH 0.1M solution and wash 4 times as previously described.
4. Add 100 µL of specific conjugate 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. It is recommended to use multichannel pipettes for increased speed and homogeneity. Keep the plate for **15 min at room temperature (20°C to 25°C).**
9. Add 100 µL of stop solution to each well following the same order used for substrate dispensation.
7. Read the optical density at 450 nm of each well using an ELISA reader within 5 min after the addition of stop solution.

* The overnight incubation shows a higher sensitivity than the 1-hour protocol in samples with low antibody titer.

READING AND RESULTS INTERPRETATION

VALIDATION OF THE TEST:

Test results should be considered valid only if the OD of the Negative Control is, at least ,4 times higher than the OD of the Positive Control:

$$\frac{\text{Neg control DO (NC)}}{\text{Pos control DO (PC)}} \geq 4$$

RESULTS INTERPRETATION:

When samples are tested in duplicate, OD of the sample should be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

Cut off calculation for optical density:

The positive and negative cut off values are calculated as follows:

- Positive Cut Off = NC - [(NC - PC) x 0.5]
- Negative Cut Off = NC - [(NC - PC) x 0.4]

Where: NC = OD of the Negative Control Serum

PC = OD of the Positive Control Sera.

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

Cut off calculation for blocking percentage:

For calculating the blocking percentage (x %) of a sample you should proceed as follows:

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

For blocking percentage, the following cut off should be applied:

- POSITIVE samples, X% ≥ 50%
- NEGATIVE samples, X% ≤ 40%
- DOUBTFUL samples, 40% < X% < 50%. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this serum (IFI, Indirect ELISA, etc.).

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA

C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



9191.INGE
9175.INGE

Distribuido en
Distributed in

por
by