

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



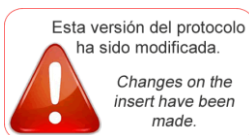
## INGEZIM PPV

Prod Ref: 11.PPV.K1

Ensayo inmunoenzimático para la  
detección y/o cuantificación de  
anticuerpos específicos de parvovirus  
porcino en suero de cerdo

Enzyme immunoassay for detection  
and/or quantification of antibodies  
against porcine parvovirus in pig serum

Última revisión / Last revision: 10-04-15  
Registrado por el MAPA nº 1211 RD



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 listo para su uso Vials positive control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	300 µl	2	300 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente 5x concentrado (DE01-05) Bottles with diluent 5x concentrated (DE01-05)	1	100 ml	1	100 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) Bottles with Substrate	1	30 ml	1	60 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 TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto (**ELISA Indirecto**). Esta técnica presenta numerosas ventajas frente al resto de las técnicas descritas hasta el momento como indicadas para la titulación de anticuerpos frente a esta infección: mayor índice de sensibilidad, especificidad, rapidez y fácil automatización.

El fundamento de esta técnica se describe muy brevemente a continuación:

Se tapiza la superficie de una placa con antígeno viral. Sobre esta superficie tapizada de antígeno, se dispensan los sueros a testar. En el caso de existir anticuerpos específicos frente al antígeno de la placa, estos se unirán mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Tras lavar la placa eliminando el material no adherido, revelaremos la presencia de anticuerpos adheridos, mediante la utilización de un conjugado de peroxidasa específico para inmunoglobulinas porcinas añadiendo posteriormente el sustrato del enzima que en

presencia de esta dará lugar a una reacción colorimétrica. La aparición de color indicará la presencia de anticuerpos en el suero analizado.

En el caso de interesar el título de anticuerpos presentes en el suero, deberán hacerse diferentes diluciones del mismo y llevar a cabo el análisis con cada una de estas diluciones. El título vendrá dado por la mayor dilución en la que puedan detectarse la presencia de anticuerpos de manera significativa.

En este kit, el antígeno fijado a la placa, se trata de un antígeno obtenido por procedimientos de expresión de proteínas virales en baculovirus. Mediante esta técnica, conseguimos expresar la proteína mayoritaria del virus en baculovirus crecidos in vitro. La proteína así obtenida tiene la propiedad de formar cápsidas idénticas al virus de campo y por lo tanto antígenicamente funciona de igual manera al virus completo, con la ventaja de carecer totalmente de capacidad infectante ya que son cápsidas vacías.

## 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. Para cada utilización del kit, preparar una solución de sustrato fresca.
10. Incluir sistemáticamente control positivo y control negativo siempre que se utilice el kit.
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.** La solución de frenado precipita a esta temperatura. Calentar a 37°C antes de su uso.

## 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 si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden 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 la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

## V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

- **Para screening positivo / negativo:** Diluir la muestra 1/100 en el diluyente suministrado.
- **Para titulación a pocillo único:** diluir la muestra 1/200 en diluyente. (ver apartado IX "titulación a dilución única).
- **Para la titulación real de los sueros:** se recomienda realizar ocho diluciones en base 2 a partir de la 1/100. Para ello tomar 5 µl de cada muestra y llevarla a 0,5 ml con diluyente de sueros.y a partir de ésta realizar siete diluciones más en base 2

Para facilitar el proceso, este paso puede realizarse directamente en los pocillos de la paca como se indica a continuación:

- Añadir 200 µl de la dilución 1/100 al primer pocillo de cada columna.
- Añadir 100 µl de diluyente a los 7 pocillos restantes de cada tira.
- Transferir 100 µl del primer pocillo al segundo, mezclar bien y proceder de la misma forma hasta el último pocillo. Descartar 100 µl del último pocillo.

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

### • **Solución de lavado:**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 2,4 litros de agua). Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

### • **Diluyente :**

Diluir 1 parte de diluyente en 4 partes de agua destilada (100 ml de concentrado mas 400 ml de agua). Una vez preparada la solución permanece estable entre +2°C y +8°C.

### • **Preparación de Controles (+) y (-):**

Los controles vienen listos para su uso. A partir de aquí realizar siete (7) diluciones más en base 2, en caso de querer titular el control positivo.

### • **Preparación del Conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**

Realizar una dilución 1/100 en diluyente:

- La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente.
- La cantidad necesaria y suficiente para una tira es : 10 µl de conjugado en 1 ml de diluyente .

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

### • **Preparación de sustrato:**

Listo para usar

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de control positivo sin diluir en dos pocillos de la primera fila de la placa (o en 8 si se opta por titular diluciones del control) y 100 µl de control negativo en otros dos pocillos de la segunda fila. Dispensar 100 µl de cada dilución de los sueros problema en el resto de los pocillos de la placa. Tapar la placa e **incubar 1 h a 37°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado anteriormente.
4. Añadir 100 µl de Conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo.

Tapar la placa **en incubar 1 h a 25°C** (temperatura ambiente).

5. Lavar 5 veces según procedimiento indicado.

6. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción **durante 10 minutos a temperatura ambiente**.

Para la realización de este proceso, resulta conveniente la utilización de una pipeta multicanal para agilizar el proceso.

7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Es recomendable añadirla en el mismo sentido en que se dispuso la solución sustrato.

8. Leer a 405 nm de longitud de onda en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realiza a una longitud de onda de **405 nm**.

### Interpretación de resultados:

#### ♦ **Validación del ensayo:**

Para que el resultado del kit se considere válido, han de cumplirse las siguientes premisas:

- a. DO Control Positivo > 1.500
- b. DO Control Negativo < 0.300

El punto de corte positivo/negativo equivale a una DO de 0.3. De manera que las muestras con valores de DO superiores ó iguales a 0.3 se consideraran positivas y por debajo de este valor, se considerarán negativas.

En el caso de buscar el título del suero, este será la máxima dilución que presente un valor de DO superior ó igual a 0.3.

## I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). We make a brief description of the technique below:

We fix the antigen on a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera sample, we can detect the presence of swine immunoglobulins using a specific peroxidase conjugate. After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which could be measured by a spectrophotometer.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies against the virus in the swine sera, and the absence of colour the absence specific antibodies.

The aim of this kit is provide to the users with a reliable and automatizable diagnostic technique for this disease, that till this time is been made by the Hemagglutination Inhibition test. In our kit is important to remark the use of antigen obtained by the expression of the viral proteins in baculovirus growth in insect cell cultures. This method warranties the total absence of infectivity in the kit.

## 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 handle whit care.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored at 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

- **For SCREENING POSITIVE / NEGATIVE:** Dilute the sample 1/100 in the diluent supplied.
- **For APROXIMATION TO TITRE:** Use a single dilution of 1/200 (See section IX for single-well titration approach).

## INGEZIM PPV 11.PPV.K1

- **For real TITRATION** of pig serum, we recommend to assay two-fold dilution starting from 1/100 (5µl of sample and 495 of diluent), ranging to 1/12800.
- To ease the process, this step could be done directly on the plate as follows:
- Add 200 µl of 1/100 dilution to the first well of each column.
  - Add 100 µl of diluent to the seven remaining wells of each row.
  - Transfer 100 µl from the first well to the second, mix well and proceed in the same way till the last well (discard 100µl from the last well).

## 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. 100 ml of concentrate with 2,4 L of water). When ready this solution remains stable between +2°C and +8°C.
  - **Preparation of Diluent:**  
Supplied diluent is 5x concentrated. Before using it, a 1/5 dilution must be done with distilled or deionized water (1 vol. of concentrated supplied Diluent with 4 volume of distilled water).
  - **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 into diluent:  
→ The necessary and sufficient quantity for a complete plate is 110 µl of conjugate with 10 ml of diluent.  
→ The necessary and sufficient quantity for an 8 well strip is 10µl of conjugate with 1 ml of diluent.
  - **Preparation of the substrate:**  
Ready to use.
- Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

## VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive control serum, to two wells of the first row of the plate and 100 µl of the negative control serum to other two wells. Add 100 µl of each dilution of sera samples to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate (use one row per serum). Seal the plate **and incubate for 1 h at 37°C**.
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 25°C** (room temperature).
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.
8. Read the absorbance of each well with a spectrophotometer at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

### ◆ Validation of the plate:

Test is only valid when:

- OD Control (+) is higher than 1.500.
- OD Control (-) is lower than 0.300.

### ◆ Results Interpretation:

The Cut Off value is 0.3.

Samples with an OD  $\geq$  than Cut Off Value are positives and samples with OD lower than Cut Off value are negatives.

The titre of the sample will be the last dilution of the sample showing an OD  $\geq$  than the Cut Off value.

## IX. ADAPTACION DEL PROTOCOLO PARA LA TITULACION A DILUCION UNICA / TITER APPROXIMATION USING A SINGLE DILUTION OF SERA SAMPLES:

### Español

Dado que el valor de DO, dentro de un rango, es directamente proporcional al título de anticuerpos presentes en la muestra, es posible realizar una aproximación del título de un suero basándonos en el valor de DO obtenido para esa muestra a una dilución única determinada.

Para aplicar esta interpretación, el procedimiento a seguir durante el ensayo es idéntico al descrito con anterioridad. La diferencia se encuentra en la preparación de las muestras a testar. **La única dilución de las muestras a utilizar es la 1/200** y cada muestra deberá ser ensayada por duplicado, de forma que se atribuirá como resultado del ensayo el valor de DO medio entre los dos duplicados.

### Interpretación de resultados :

Tal y como ya se ha indicado, a cada muestra de suero se le atribuirá el valor medio de las DO obtenidas para los dos pocillos en los que se ha ensayado dicho suero. Determinar la relación muestra / control (S/P) de las muestras positivas de la siguiente manera:

*Es importante resaltar que el presente ajuste de títulos con arreglo al valor de DO de un suero, se trata de una aproximación y como tal ha de interpretarse. Siempre que surjan dudas o que se pretenda realizar una titulación exacta se recomienda titular cada suero de la manera habitual (testando diferentes diluciones).*

### English

Some times it is enough to have an approximate titter for the samples. In these cases, it is not needed to run 8 dilutions per sera and using a single dilution of 1/200 you may know the approximate titter.

This adjustment is based on the existing correlation between the OD value of a sample and the antibody concentration.

The procedure, to apply this interpretation, is the same as the indicated for screening. The only and important difference is the preparation of the samples. **The dilution must be 1/200** and each sample must be run in duplicate. The result of the assay will be the average between both OD values.

### Results interpretation:

Each sample will have a value of OD which will be the average between two OD values. With this average, a S/P relation must be calculated:

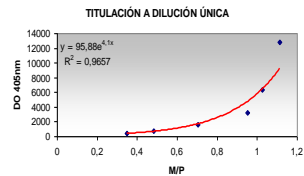
$$X = S/P = \frac{\text{Average of OD values of the sample}}{\text{Average of positive control OD values}}$$

$$X = S/P = \frac{\text{Media de DO de la muestra (1/200)}}{\text{Media de DO del Control positivo}}$$

El título de los sueros positivos, se determinará aplicando la siguiente fórmula :

$$y = 95,88e^{4,1x}$$

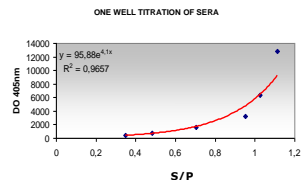
Donde x es el valor medio de DO de cada muestra a la dilución 1/200 corregido respecto al control positivo y "e" es la base del logaritmo natural (2,71828).



The titre of positive sera will be determined applying the following formula:

$$y = 95,88e^{4,1x}$$

Where x is the s/p value of each sample at dilution 1/200 and "e" is the natural logarithm base (2.71828).



*It is important to remark that this is just an approximation of the titre. If there are some doubts about the results or an exact titre is had being required, we recommend to titre the samples using different dilutions.*

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)  
Tlf: +34 91368.05.01/04  
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: