



INGEZIM PPA COMPAC

Prod Ref: 11.PPA.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo
para la detección de anticuerpos
específicos frente al virus de la Peste
Porcina Africana (VPPA)
en suero de cerdo

Blocking immunoenzymatic assay for
detection of antibodies to African Swine
Fever virus (ASFV) in porcine serum.

Ultima revisión / Last revision: 18-12-18
Nº de registro en España/Registration number in Spain:335 RD

Version 18-12-18:

Uso de nuevo diluyente de suero /*use of new serum diluent*



COMPOZITIA

Reagent	2 plates box (2x8x12 wells)		5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
96 well microtitration plates. Placi de microtitrare cu 96 de godeuri	2	-	5	-
Vials containig Positive Control milk for Brucella Flacon Control Pozitiv	1	1 ml	2	1 ml
Vials containing Negative Control milk for Brucella Flacon Control Negativ	1	1 ml	2	1 ml
Vials containing Conjugate specific (100x) Flacon Conjugat specific (100x)	1	350 µl	2	350 µl
Bottles with washing solution 25x concentrated Sticla Solutie Spalare 25X concentratie	1	125 ml	1	125 ml
Bottles with conjugate diluent (DE01-1) ready to use Sticla diluant Conjugat (DE01-1) gata pentru utilizare	1	125 ml	1	125 ml
Bottles with serum diluent (DE31-1) ready to use Sticla diluant pentru Ser (DE31-1) gata pentru utilizare	1	60ml	1	60ml
Bottles containig substrate (TMB) ready to use Sticla substrat (TMB) gata pentru utilizare	1	30 ml	1	60 ml
Bottles containing stoping solution Sticla Solutie Stop	1	60 ml	1	60 ml

ALTE MATERIALE NECESARE DAR UN SUNT FURNIZARE IN KIT:

Apa distilata si deionizata
Micropipete de la 5 la 200 µl.
Varfuri de unica folosinta pentru micropipete
Dispozitiv pentru spalarea placilor.
Eprubete 50-250ml
Cititor ELISA (450 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 (450 nm filter)

I. BAZA TEHNICA

Acest kit se bazează pe un test imunoenzimatic de blocare (Blocking Elisa).
Facem mai jos o scurtă descriere a tehnicii:

Antigenul se fixează într-un suport solid (placă de polistiren). Când o probă de ser conține anticorpi specifici împotriva virusului, aceștia se vor lega de antigenul absorbit pe placă, în timp ce, dacă proba de ser nu conține anticorpi specifici, ei nu se vor lega de antigen. Dacă adăugăm un anticorp monoclonal specific (Mab) împotriva antigenului viral acoperit pe placă (conjugat cu peroxidază), acesta va concura cu anticorpii serului. Dacă probele de ser conțin anticorpi specifici, vor

permite legarea Mab marcat la antigen, în timp ce dacă nu conține anticorpi specifici, Mab se va lega de antigenul de pe placă. După spălarea plăcii pentru a elimina tot materialul nefixat de pe placă, putem detecta prezența sau absența Mab-ului marcat prin adăugarea de substrat specific care în prezența peroxidazei va dezvolta o reacție colorimetrică.

Antigenul acoperit pe placa din Kit constă dintr-un extract proteic purificat din virusul (VP72), care este proteina structurală majoră din ASFV și cea mai antigenică.

II. PRECAUȚII ȘI AVERTIZĂRI PENTRU UTILIZATORI:

1. Citiți atent instrucțiunea de lucru.
2. Aduceți reagenții la temperatură camerei (20°-25°C) înainte de lucru.
3. Nu amestecați instrucțiuni sau reactivi din diferite kituri.
4. Evitați orice contaminare a reactivilor kitului.
5. Nu utilizați componente după datele de expirare și nu amestecați componente din loturi diferite.
6. Nu ar trebui să se mănânce, să se bea sau să se fumeze acolo unde se manipulează specișenele sau reactivii trusa.
7. Nu pipetați pe gura.
8. Folosiți un varf nou pentru fiecare probă de ser.
9. Soluția de stopare este o soluție acidă puternică care trebuie utilizată cu precauție. În caz de contact accidental cu pielea, spălați ușor cu apă.
10. Pentru fiecare utilizare a kitului, serul de control pozitiv și negativ trebuie testat într-un mod sistematic.
11. Substratul trebuie să fie manipulat cu grijă, este foarte sensibil la lumină și contaminare.

III. PASTRAREA COMPONENTELOR

Toti reagenții și plăcile trebuie păstrate la +2°C +8°C.

Odată deschise, serurile de control sunt stabile timp de o lună între +2°C și +8°C. În cazul în care nu vor fi folosite în această perioadă, vă recomandăm să le păstrați la sub -20°C.

IV. INFORMATIA DESPRE ETAPELE DE SPALARE

Etapele de spălare ar putea fi efectuate folosind o mașină de spălat automată sau un dispozitiv de pipetare multicanal adecvat pentru distribuirea a 300 μl pe fiecare godeu.

După perioadele de incubare, etapele de spălare trebuie efectuate urmând următoarele instrucțiuni:

- Aruncați conținutul plăcii printr-o răsturnare bruscă a plăcii pentru a evita posibila amestec al conținutului dintr-un godeu în altul.
- Distribuți un volum de 300 μl de soluție de spălare pe fiecare godeu.
- Agitați delicat placa, evitând contaminarea dintre godeuri.
- Întoarceți brusc placa pentru a goli godeurile.



- Repetați procesul de câte ori este indicat în instrucțiunile trusei.
- Înainte de a goli conținutul ultimei etape de spălare, verificați dacă următorul reactiv care trebuie adăugat pe placă este gata de utilizare. Nu mențineți placa uscată mai mult decât este strict necesar.

- După ultima etapă de spălare se agită placa răsturnată peste o hârtie de filtru absorbantă.

V. PREGATIREA PROBELOR

Probele care urmează să fie utilizate în test trebuie să fie seruri porcine. **Nu utilizați mostre foarte hemolizate sau contaminate. Este posibil să obțineți rezultate fals pozitive.**

Pentru a fi testată proba, trebuie făcută o ½ diluție în diluantul seric furnizat (DE31). Această diluție se poate face direct pe placă prin adăugarea a 50 µl de diluant seric și 50 µl de ser în fiecare godeu.

VI. PREPARAREA REAGENTILOR

• **Solutia de spalare:**

Se diluează o parte din soluția de spălare concentrată furnizată în kit cu 24 de părți de apă distilată sau deionizată (adică 40 ml de concentrat plus 960 ml de dH₂O). Când este gata, această soluție rămâne stabilă între +2°C și +8°C până la data de expirare descrisă pe eticheta soluției concentrate.

• **Derurile de control:**

Odată deschise, serurile de control sunt stabile timp de o lună între +2°C și +8°C. În cazul în care nu vor fi folosite în această perioadă, vă recomandăm să le păstrați sub -20°C.

Serurile de control trebuie diluate ½ în diluant înainte de a fi utilizate, în același mod ca probele de ser (puteți face diluția direct în placă adăugând 50 µl de diluant plus 50 µl de ser de control).

• **Pregătirea conjugatului: se va pregăti înainte de utilizare**

Diluati cantitatea necesară de conjugat furnizată în kit 1/100 în diluantul de conjugat furnizat (DE01) (de exemplu, 110µl de conjugat în 11 ml de diluant de conjugat este o cantitate suficientă pentru o placă). Agitați foarte bine soluția înainte de utilizare. Pregătiți doar cantitatea necesară pentru fiecare dată deoarece volumul rămas trebuie aruncat.

VII. PROCEDURA DE TESTARE

1. Toți reactivii (cu excepția conjugatului) trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare.
2. Adăugați 50 µl de diluant seric furnizat în fiecare godeu. Adăugați 50 µl de ser de control pozitiv în două godeuri (de exemplu, A1 și B1) și 50 µl de ser de control negativ (de exemplu, A2 și B2). Adăugați 50 µl de probe de ser pentru a testa fiecare godeu rămas. Recomandăm utilizarea a două godeuri pentru fiecare control. Sigilați placa și **incubați timp de 1 h±5min la 36±1°C sau peste noapte (16-20 ore) la 20-25°C.**
3. Goliți godeurile într-un container cu soluția de NaOH și spălați de 4 ori conform instrucțiunii.
4. Adăugați 100 µl de conjugat specific (preparat conform instrucțiunilor anterioare) în fiecare godeu. Sigilați placa și **incubați timp de 30 de minute la 36±1°C..**
5. Spălați de 5 ori în conformitate cu instrucțiune.
6. Adăugați 100 µl de substrat în fiecare godeu. Păstrați placa timp de 15 minute la temperatura camerei (20-25°C).
7. Adăugați 100 µl de soluție stop în fiecare godeu
8. Citiți OD a fiecărui godeu la 450 nm în 5 minute după adăugarea de soluție stop.



VIII. CITIREA SI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Validarea testului

Testul poate fi considerat valid atunci când OD a controlului negativ (NC) este de cel puțin 4 ori mai mare decât OD a controlului pozitiv (PC):

$$NC / PC \geq 4$$

Interpretarea:

A. – calcularea Cut off:

$$\begin{aligned} \text{Cut Off Pozitiv} &= NC - [(NC - PC) \times 0.5] \\ \text{Cut Off Negativ} &= NC - [(NC - PC) \times 0.4] \end{aligned}$$

Unde: NC = OD valoarea Controlului negativ
PC = OD valoarea Controlului pozitiv.

Pentru a calcula % de blocare (x %) a probei:

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

≥ 50% pozitiv

≤ 40% negativ

Procentele între cele două valori sunt considerate suspecte

B. – Interpretarea rezultatelor:

Când se lucrează în paralele, OD a probei va fi calculată ca medie aritmetică a valorilor OD în ambele godeuri.

- Probele de ser cu OD mai mică decât Positive Cut Off, sunt considerate POZITIVE pentru anticorpii ASFV
- Probele de ser cu OD mai mare decât Negative Cut Off, vor fi considerate NEGATIVE pentru anticorpii ASFV.
- Probele de ser cu valori OD între ambele cut-off sunt considerate suspecte. Vă recomandăm să mai testați aceste animale încă o dată sau să aplicați o altă tehnică pentru a verifica acest ser.

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
www.ingenasa.es



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2

Distributed in

by: