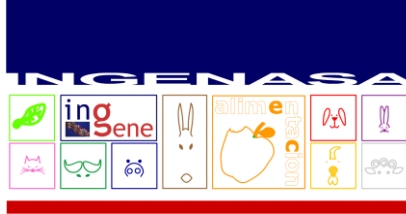


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM ADV gB

Prod Ref: 11.GB.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo
para la detección de anticuerpos
específicos frente a la glicoproteína gB
del Virus de la Enfermedad de Aujeszky
en suero de cerdo

Blocking immunoenzymatic assay for
the specific detection of antibodies to
Aujeszky disease virus gB glycoprotein
in pig serum.

Ultima revisión / Last revision: 18-06-21

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 0809 RD

Version 18-06-21:

Uso de nuevo diluyente de suero DE31 /*Use of new serum diluent DE31*

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas divisibles (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas divisibles (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)		5 placas 5x(96 pocillos) 5 plates box 5 x(96 wells)		10 placas 10x(96 poc.) 10 plates box 10 x(96 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.			Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos 96 Well coated plates	-	-	-	-	5	-	10	-
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras de 8 pocillos 96 Well coated strip plates divided in 12 strips of 8 wells each	2	-	5	-	-	-	-	-
Viales de suero Control Positivo Vials of Positive Control Serum	1	2 ml	2	2 ml	1	2 ml	1	2 ml
Viales de suero Control Negativo Vials of Negative Control Serum	1	2 ml	2	2 ml	1	2 ml	1	2 ml
Viales de Conjugado-HRPO específico de gB (listo para su uso) Vials with Conjugate -HRPO gB specific (ready to use)	1	30 ml	2	30 ml	2	30 ml	1	110 ml
Frascos de Solución de Lavado 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml	1	125 ml	1	250 ml
Frascos de Diluyente de suero listo para su uso (DE31-01) Bottles with serum diluent ready to use (DE31-1)	1	15 ml	1	15 ml	1	15 ml	1	30 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml	1	60 ml	1	60 ml	1	120 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 ml	1	60 ml	1	120 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 450 nm)

Distilled or deionized water.
Micropipettes from 5 to 200 µl.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 ml
ELISA Reader (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

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

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno específico del virus de Aujeszky. Cuando sobre el antígeno se dispensan los sueros a testar y a continuación un anticuerpo monoclonal (conjugado con peroxidasa) específico para la proteína gB del virus, en el caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al virus, estos se unirán a el imposibilitando la unión del monoclonal, mientras que si el suero problema carece de dichos anticuerpos, será el

monoclonal 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, podremos revelar la presencia o ausencia de monoclonal marcado, añadiendo un sustrato adecuado, que en presencia de peroxidasa dará lugar a una reacción colorimétrica medible. De esta forma, la presencia de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente a la proteína gB del virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos.

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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Conservar 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 para posteriores utilizaciones.

Si el diluyente de suero precipita, calentar a 37°C.

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 delicadamente 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 ultimo 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 necesita añadir 80 µl de suero por pocillo.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

◆ **Solución de lavado:**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado mas 960 ml de agua).una vez preparada la solución, es estable entre +2°C y +8°C.

◆ **Preparación de controles (+) y (-) :**

Los sueros controles se utilizaran como las muestras (80 µl/pocillo).

◆ **Preparación del Conjugado:**

El conjugado se presenta listo para su uso.

VII. PROCEDIMIENTO

- Equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (20-25° C) antes de iniciar el ensayo.
- Añadir 20 µl de diluyente de suero a cada pocillo. A continuación, añadir 80 µl/pocillo de las muestras. Hacer lo mismo para los sueros controles (por duplicado). Es recomendable aunque no imprescindible hacer las muestras por duplicado. Agitar, sellar la placa e incubar **1h a 37°C ó 16-18 horas a 4°C**.
- Lavar 3 veces con solución de lavado.
- Añadir 100 µl/pocillo del conjugado. Tapar la placa e **incubar 30 minutos a 37°C**.
- Lavar 5 veces con solución de lavado.
- Secar bien y añadir 100 µl/pocillo del sustrato. Incubar **10 minutos en oscuridad**.
- Parar la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de la solución de frenado.
- Leer a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. INTERPRETACION Y LECTURA DE RESULTADOS:

1. VALIDACION DEL TEST

- Abs₄₅₀ del C. Negativo debe ser mayor de 0.8**
- Abs₄₅₀ del C. Positivo debe ser menor de 0.3**

2. CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (PI)

$$PI = [1 - (M / CN)] \times 100$$

Donde:

CN es la media de Abs₄₅₀ del Control Negativo
M es la media de Abs₄₅₀ de la muestra

3. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Una muestra es negativa (no contiene anticuerpos para gB) cuando su PI es menor del 30%

La muestra es positiva (contiene anticuerpos para gB) cuando su PI es mayor o igual del 30%.

4. EJEMPLO:

Abs₄₅₀ CN = 1.360
Abs₄₅₀ CP = 0.110
Abs₄₅₀ Muestra 1 = 0.373
Abs₄₅₀ Muestra 2 = 1.295

Validación:

CN = 1.360 (> 0.8)
CP = 0,110 (< 0.3)

PI muestra 1 = [1 - (0.373/1.360)]x100=72.5
PI muestra 2 = [1 - (1.295/1.360)]x100=4.7

Interpretación:

Muestra 1: Positiva a gB
Muestra 2: Negativa a gB

I. TECHNICAL BASIS

The gB test uses a monoclonal antibody (Mab) specific for gB glycoprotein of ADV and microtiter plates coated with ADV antigen. After sample addition, if antibodies are absent in the test serum, the gB antigen will remain free and the Mab peroxidase-conjugated specific for gB, will bind. After substrate addition a colour

reaction is produced. On the other hand, if gB antibodies are present in the test sample they will bind to the gB antigen of the well and will block the binding of the conjugated Mab. In this case no colour reaction will be produced.

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 must be handle with care, it is very sensible to light and contamination
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored between +2°C and +8°C. **Once opened**, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°C.

Warm a 37°C the serum diluent if precipitation occurs.

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

Serum samples and controls must be used without previous dilution adding 80µl/well.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

• **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water. When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

• **Conjugate:**

The conjugate is ready to use.

♦ **Controls (+) & (-) :**

Control sera should be used like samples (80 µl/well).

VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 20 µl of serum diluent to each well and then, 80 µl of serum (controls and samples) to each well. Gently, mix the plate, seal it and incubate for **1 hour at 37°C or 16-18 hours at 4°C**.
- Wash 3 times following the described procedure (point IV)
- Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at 37°C**
- Wash 5 times following the procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature** in a dark place.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

A.- TEST VALIDATION

The test must be considered valid if:

- **Positive control OD is Lower than 0.3**
- **Negative control OD is higher than 0.8**

B.- INHIBITION PERCENTAGE (IP) VALUES CALCULATION:

$$IP = [1 - (M / CN)] \times 100$$

Where: CN= Mean of OD_{450nm} of Negative control
M=Mean of OD_{450nm} of the sample

C.- RESULT INTERPRETATION:

IP higher than 30%: Positive samples
IP lower than 30%: Negative samples

D.- PRACTICAL EXAMPLE:

OD₄₅₀ CN = 1.360
OD₄₅₀ CP = 0.110
OD₄₅₀ Sample 1 = 0.373
OD₄₅₀ Sample 2 = 1.295

Validation:
CN = 1.360 (> 0.8)
CP = 0,110 (< 0.3)

IP sample 1 = [1-(0.373/1.360)]x100=72.5
IP sample 2 = [1-(1.295/1.360)]x100=4.7

Interpretation:

Sample 1: Positive to gB antibodies (the animal has been in touch with a vaccinal and/or field ADV strain).

Sample 2: Negative to gB antibodies (the animal has never been in touch with any of ADV strains. This result will be obtained with non-infected and non-vaccinated pigs).

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

Eurofins-INGENASA
Av.de la Institución Libre de Enseñanza 39,
8ª planta
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



Distributed in by: