

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



## INGEZIM ADV TOTAL

Prod Ref: 11.ADV.K1

Ensayo inmunoenzimático para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos del virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) en suero porcino

Indirect immunoenzymatic assay for detection and/or titration of antibodies to Aujeszky' Disease virus (ADV), in porcine serum

Última revisión / Las revision: 20-11-08  
Registrado por el MAPA nº 392 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	2,5 ml	2	2,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	2,5 ml	2	2,5 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	350 µl	2	350 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente (DE14-01) Bottles with diluent (DE14-01)	1	125 ml	2	125 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	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 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. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, 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 suero porcino mediante un conjugado específico (anti-inmunoglobulinas de cerdo) marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción

colorimétrica que podrá ser leída mediante un lector de placas de ELISA.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente al ADV (cepas vacunales y de campo), mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

El kit puede utilizarse para diferenciar animales que presentan anticuerpos frente al virus (cepas vacunales y de campo) de los que no los presentan (screening), utilizando un pocillo por suero, y además para conocer el título de anticuerpos que presenta un animal en concreto, utilizando la fórmula que se indica en la interpretación de resultados..

## 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. Usar únicamente agua destilada para la preparación de los reactivos.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. Tanto el sustrato (el TMB es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones) como la solución de frenado (es un ácido fuerte) deben ser manipulados con precaución.

## III. CONSERVACION DEL KIT

**Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°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. 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 infectivos.
- 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 realizar la prueba, los sueros problema se utilizará a la dilución 1/25 en diluyente de suero (DE14-01). (P.ejemplo. 10 µl de suero mas 240 µl de diluyente).

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

### • Solución de lavado:

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada. Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

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

Los controles suministrados en el kit se encuentran listos para su uso en el ensayo (**no diluir**).

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

Diluir 1/100 en diluyente, DE14-01 (110 µl de conjugado concentrado en 11 ml de diluyente es suficiente para una placa).

Preparar únicamente el volumen que se vaya a utilizar ya que la solución restante ha de ser desechada.

## VII. PROCEDIMIENTO:

- Antes de empezar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
- Añadir 100 µl de cada muestra a testar (preparada según se indica en el punto V) por pocillo. Con fines confirmatorios, se recomienda hacer duplicados de cada muestra. Hacer lo mismo con los controles (+) y (-). Tapar la placa e **incubar a 1 hora a 37°C**.
- Lavar cuatro veces según procedimiento descrito en punto IV.
- Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 30 minutos a 37°C**.
- Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
- Añadir 100 µl de sustrato por pocillo. Mantener la reacción **5 minutos a temperatura ambiente**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar lo más posible este proceso.
- Añadir 100 µl de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Añadir a este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.
- Leer a **450 nm en un lector de Elisa** en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realiza con un colorímetro a una longitud de onda de **450 nm**.

### 1. Validación de resultados:

El test se considerara válido cuando:

$DO_{450nm}(\text{Control } +) > 0,5$

$DO_{450nm}(\text{Control } -) < 0,2$

### 2. Cálculo de S/P:

La relación S/P es la DO a 450 nm de la muestra dividida por la DO del Control +.

### 3. Interpretación de resultados:

- Las muestras con S/P mayores de 0,35 se consideraran como positivas a anticuerpos para el virus de Aujeszky.
- Las muestras con S/P menores de 0,35 serán consideradas negativas

### 4. Cálculo del título:

Se aplicará la fórmula:

$Y(\text{título}) = 40 * (e^{1,9 * x})$

Siendo **x** la S/P de la muestra y **e** la base del logaritmo natural

### 5. Ejemplo:

	<b>DO</b>
<b>Control +</b>	<b>0,743</b>
<b>Control -</b>	<b>0,102</b>
Muestra 1	0.910

#### • Validación:

Control Positivo = 0,743 (> 0,5)

Control Negativo = 0,102 (< 0,2)

#### • Cálculo de S/P

S/P de Muestra 1 = 0,910/0,743 = 1,22

#### • Interpretación de resultados

Positiva (> 0,35)

#### • Título de la muestra "1"

a)  $S/P(x) = 0,910 / 0,743 = 1,22$

b) cálculo del título:

título =  $40(e^{1,9 * 1,22}) = 406$

## I. TECHNICAL BASIS

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

The antigen (ADV proteins) is fixed in a solid support (polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the serum sample does not contain specific antibodies they will not bind the antigen. If we add a specific monoclonal antibody against the porcine immunoglobulins (conjugated with peroxidase), it will bind the antibodies of the serum. If the serum sample

contains specific antibodies, conjugate will bind them, whereas if it does not contains specific antibodies the conjugate will be eliminated in the following washing step. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled conjugate by adding the specific substrate that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

The antigen coated to the plate in our kit consists of a soluble protein extract from the virus containing all the antigenic proteins present in vaccine strains as well as in field strain.

## 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. Substrate must be handled with care because it is very sensitive to light and contamination
10. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
11. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2°C and +8°C.

## 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 SAMPLES:

Samples to be used in the assay must be porcine sera.  
1/25 dilution of the sera must be done in diluent (10 µl of sera and 240µl of diluent).

## 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. When ready this solution remains stable at +4°

### • **Control sera:**

Controls are supplied ready to use. Do not dilute

### • **Diluent:**

Diluent is 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 DE14-01 (e.g.110 µl of conjugate into 11ml of diluent is enough quantity for one plate).

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:

- All reagents (except conjugate) must bring to room temperature before use.
- Add 100 µl of positive control serum to two wells (e.g. A1 and B1), and 100 µl of the negative control serum to other two wells (e.g. A2 and B2). Add 100 µl of sera samples to test (prepared as specified in point V), on each remainder wells. We recommend the use of two wells per sample. Seal the plate and incubate for **1 h at 37°C**.
- Wash four times as specified in point V.
- Add 100 µl of specific conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Cover the plate and incubate the plate for **30 minutes at 37°C**.
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature**.
- Add 100 µl of stop solution, to each well.
- Read the OD of each well at **450nm** within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

### 1. Validation of the test

The test could be considered valid when:

- The OD of the Negative Control (NC) is lower than 0.2
- The OD of the Positive Control (PC) is higher than 0,5

### 2. S/P Calculation:

When you are running duplicates, OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

- a) Calculate the S/P

$$S/P = \frac{S}{PC}$$

Where,  
S is the sample OD  
PC is the positive control OD

### 3. Interpretation :

- Samples with s/p higher Than 0.35 should be considered positive-
- Samples with s/p lower than 0.35 should be considered negative.

### 4. Titre of the sample :

- The titre of positive samples will be determined as follow:

$$\text{Titre} = 40 * (e^{1.9x})$$

Where, **e** is the natural logarithm base and **x** is the S/P of the sample.

---

## 5. Example:

---

	<u>DO</u>
<b>Control +</b>	<b>0,743</b>
<b>Control -</b>	<b>0,102</b>
Sample 1	0.910

### 1. Validation:

Positive control OD value = 0,743 (> 0,5)

Negative control OD value = 0,102 (< 0,2)

### 2. S/P Calculation

$$s/p \text{ Sample} = 0.910/0.743 = 1,22$$

### 3. Interpretation

Positive Sample ( > 0,35)

### 4. Titre of Sample "1"

a) S/P (x)

$$x = 0,910/ 0,743 = 1.22$$

b) Titre calculation

$$\text{Titre} = 40 (e^{1.9 \times 1,22}) = 406$$

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)  
Tif: +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: