



INGEZIM ADV gE PLUS

Prod Ref: 11.GEP.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente a la proteína gE del virus de la enfermedad de Aujeszky en muestras de suero porcino.

Bolcking immunoenzymatic assay for specific antibodies detection to gE protein of the Aujeszky disease virus in porcine sera samples.

Última revisión / Last revision: 25-08-15
Registrado por el MAPA nº 1126RD

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (2x8x12 pocillos) 5 plates box (2x8x12 wells)		25 placas (25x96 pocillos) 25 plates box (25x96 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación Microtitulation Plates	2		5		25	
Viales de conjugado listo para su uso Vials with Conjugate ready for use	1	25 ml	1	60 ml	3	100 ml
Viales de suero Control Positivo Vials of Positive Control Serum	1	1.5 ml	2	1.5 ml	2	1.5 ml
Viales de suero Control Negativo Vials of Negative Control Serum	1	1.5 ml	2	1.5 ml	2	1.5 ml
Frascos de Diluyente de suero Bottles with serum diluent	1	60 ml	1	60 ml	1	250 ml
Frascos de Sustrato Bottles with Substrat	1	30 ml	1	60 ml	5	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 ml	2	250 ml
Frascos de Solución de Lavado 25x Bottles with Washing Solution	1	100 ml	1	100 ml	2	250 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.
Tips desechables
Lavador de placas
Tubos de 50 a 250 ml
Lector ELISA (filtro de 450 nm)

Distilled or deionised 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:

Inmunoensayo enzimático de bloqueo (ELISA de bloqueo).

La placa de poliestireno lleva fijado el antígeno específico del virus de Aujeszky. Se dispensan los sueros problema y los sueros control en los pocillos y a continuación un anticuerpo monoclonal (previamente marcado con peroxidasa) específico frente a la proteína Ge del virus. Si el suero problema contiene anticuerpos frente a Ge, estos se unirán al antígeno de la placa, imposibilitando la unión del monoclonal. 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. La presencia de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente a Ge en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos.

II. PRECAUCIONES:

1. Leer atentamente este manual.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits caducados.
5. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Usar únicamente agua destilada para la reconstitución de los reactivos.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. Tanto el sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS:

Almacenar todos los materiales y reactivos refrigerados 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.

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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que los sueros problema podrían 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 en el procedimiento. No dejar que la placa se seque.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de suero se analizan añadiendo 50 µl de suero sobre 50 µl de diluyente en el pocillo.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS:

• Solución de lavado : (concentrada 25x)

Diluir 1 parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución de lavado concentrada en 960 de agua destilada).

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

Los sueros control suministrados, se utilizarán a la dilución ½ (al igual que el

resto de los sueros a testar). Esta dilución puede realizarse directamente sobre la placa añadiendo en cada pocillo 50µl de diluyente y 50µl del suero control. Cuando se prevea la utilización parcial del kit, es recomendable alicuotear los sueros control y mantenerlos congelados hasta su utilización.

VII. INSTRUCCIONES DE REALIZACIÓN DEL KIT:

- Equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
- Añadir 50 µl de diluyente a cada pocillo.
- Añadir 50 µl de las muestras. Añadir 50 µl de los sueros control.
- Agitar suavemente, tapar la placa e incubar 2 horas a T.A. (20-25°C), si es posible, con agitación o una noche entre +2°C y +8°C.
- Lavar 3 veces con solución de lavado.
- Añadir 100 µl /pocillo del conjugado.
- Tapar la placa e incubar 30 min. a T.A. (20-25°C).
- Lavar 4 veces con solución de lavado.
- Secar bien y añadir 100 µl /pocillo del sustrato. Incubar entre 10 y 15 min. en oscuridad.
- Añadir 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 DE RESULTADOS:

1. Validación del ensayo:

Para que el ensayo se considere válido, han de cumplirse las siguientes condiciones:

- $CP/CN < 0.3$

CP = DO (Control Positivo)

CN = DO (Control Negativo)

- El valor de DO del Suero Control Negativo debe ser mayor de 0,8.

2. Calculos de Puntos de Corte negativo y positivo:

Punto de Corte (+) = $CN - [(CN - CP) \times 0.4]$

Punto de Corte (-) = $CN - [(CN - CP) \times 0.35]$

3. Interpretación:

- La muestra cuya DO sea superior o igual al punto de corte Negativo, deberán considerarse Negativas (no contienen anticuerpos específicos frente a gE).
- La muestra cuya DO sea inferior o igual al punto de corte Positivo, se considerarán Positivas.
- La muestra con DO comprendida entre ambos valores, se considerará dudosas. En estos casos hay repetir el ensayo (muestra por duplicado). Si se obtiene el mismo resultado, analizar una nueva muestra del mismo animal, 15 días después.

4. CÁLCULO DE % DE INHIBICIÓN (PI_M)

$$PI_M = \frac{DO_{CN} - DO_{MUESTRA}}{DO_{CN} - DO_{CP}} \times 100$$

PI ≥ 40: Muestra positiva para anticuerpos gE
 PI ≤ 35: Muestra negativa para anticuerpos gE
 40 ≥ PI ≥ 35: Muestra dudosa para anticuerpos gE

5. EJEMPLO

• **Valores obtenidos tras la lectura:**

CN = 1.160
 CP = 0.110
 Muestra 1 = 0.373
 Muestra 2 = 1.395

• **Validación:**

CP/CN = 0.110/1.160 < 0.3
 1.160 > 0.800

• **Cálculos de Puntos de Corte:**

Punto de corte (+) = 1.160 - [(1.160 - 0.110) × 0.4] = 0.740
 Punto de corte (-) = 1.160 - [(1.160 - 0.110) × 0.35] = 0.792

• **Resultados:**

Muestra 1 = Positiva para gE
 Muestra 2 = Negativa para gE

I. TECHNICAL BASIS:

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

addition a colour reaction is produced. When gE antibodies are present in the test sample they will bind to the gE antigen of the well and will block the binding of the conjugated Mab. In this case no colour reaction will be produced.

II. PRECAUTIONS:

1. Read the use instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
4. Do not use components after expiration date.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handle.
6. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination
9. Stop solution is a strong acid. Handle with care
10. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.

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.

IV. INSTRUCTIONS FOR 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.
- Dispense a volume of 300µl 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.
- 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:

The sera sample needs to be at ½ dilution to be tested. The dilution of sera samples could be done directly on the wells by adding 50 µl of serum and 50 µl of sera diluent to each well.

VI. REAGENTS PREPARATION INSTRUCTIONS:

• Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of concentrate washing solution into 960 ml of distilled water). This solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

• Positive and Negative Controls:

Controls need to be at 1/2 dilution to be tested. The dilution of control samples could be made directly on the wells by adding 50 µl of serum and 50 µl of sera diluent to each well.

VII. TEST PROCEDURE:

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 50 µl of diluent and 50 µl serum (controls and samples) to each well. Shake carefully to homogenate the mixture, seal the plate and incubate for 2 hours at R.T. (20-25°C) (preferably with agitation) or overnight between +2°C and +8°C.
3. Wash 3 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and incubate for 30 minutes at R.T. (20-25 °C)
4. Wash 4 times following the procedure.
5. Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for 10-15 min at room temperature in a dark place.
6. Add 100 µl of stop solution to each well.
7. Read the OD at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION:

1. TEST VALIDATION

- P/N ratio must be lower than 0,3:
P= OD of positive control
N= OD of negative control
- Negative control's OD must be higher than 0,800.

2. CUT OFF CALCULATION:

Positive CUT OFF= $N - [(N-P) \times 0,4]$
Negative CUT OFF= $N - [(N-P) \times 0,35]$

N= OD of Negative control (average)
P= OD of positive control (average).

3. RESULTS INTERPRETATION:

If you are running samples in duplicate wells, Optical Density (OD) value must be calculated as the arithmetic average of the two wells. Sample is positive when its OD value is lower than or equal to the Positive cut off value. Sample is negative when its OD value is higher than or equal to the negative cut off value. Samples with OD values between both cut off values must be scored as doubtful. In these cases we recommend to run a second sample of the same animal collected 2 weeks later.

4. INHIBITION PERCENTAJE CALCULATION (IP_M)

$$IP_M = \frac{OD_{CN} - OD_{MUESTRA}}{OD_{CN} - OD_{CP}} \times 100$$

IP_M ≥ 40: Sample positive to gE antibodies

IP_M ≤ 35: Sample negative to gE antibodies

40 ≥ IP_M ≥ 35: Doubtful sample to gE antibodies

5. PRACTICAL EXAMPLE:

- **Obtained OD average values:**

NC = 1.160 (N); PC = 0.110 (P)

Sample 1 = 0.373; Sample 2 = 1.395

- **Assay validation:**

P/N ratio = 0,110 / 1.160 < 0.3

1,160 > 0,800

- **CUT OFF Calculation:**

Cut Off (+) = $1,160 - \{(1,160 - 0,110) \times 0,4\} = 0,740$

CUT OFF (-) = $1,160 - \{(1,160 - 0,110) \times 0,35\} = 0,792$

- **Results:**

Sample 1 = Positive for gE

Sample 2 = Negative for gE

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
www.ingenasa.es



Distributed in _____ by: