



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.

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

Versión Doc:28.05.2024

Nº de registro en España: 1126-RD

Registration number in Spain: 1126-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas		25 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5		25	
Viales de Control Positivo	1	1,5mL	2	1,5mL	2	1,5mL
Viales de Control Negativo	1	1,5mL	2	1,5mL	2	1,5mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	25mL	1	60mL	3	100mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	100mL	1	100mL	2	250mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL	5	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL	2	250mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE31)	1	60mL	1	60mL	1	250mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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)

FUNDAMENTO TÉCNICO 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.

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 y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
8. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.
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 a -20°C.

INFORMACIÓN 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 NaOH 0,1M, ya que las muestras 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. 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.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

PREPARACIÓN 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 mL de agua destilada).

Preparación de Controles (+) y (-):

Los sueros control suministrados, se utilizarán a la dilución 1/2 (al igual que el resto de los sueros a testar). Esta dilución puede realizarse directamente sobre la placa añadiendo en cada pocillo 50 µL de diluyente y 50 µL del suero control. Cuando se prevea la utilización parcial del kit, es recomendable alicuotear los sueros control y mantenerlos congelados hasta su utilización.

PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Añadir 50 µL de diluyente a cada pocillo. Añadir 50 µL de los sueros control. Agitar suavemente, tapar la placa e incubar **2 horas a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C)**, si es posible, con agitación o una noche entre +2°C y +8°C.
3. Lavar 3 veces con solución de lavado.
4. Añadir 100 µL/pocillo del conjugado. Tapar la placa e incubar **30 min a temperatura ambiente**.
5. Lavar 4 veces con solución de lavado.
6. Secar bien y añadir 100 µL/pocillo del sustrato. **Incubar entre 10 y 15 min en oscuridad.**
7. Añadir 100 µL/pocillo de la solución de frenado.
8. Leer a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL ENSAYO:

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

$$\frac{CP}{CN} < 0,3$$

- CP = DO (Control Positivo)
- CN = DO (Control Negativo)

El valor de DO del Suero Control Negativo > 0,8

CÁLCULOS DE PUNTOS DE CORTE NEGATIVO Y POSITIVO:

- Punto de Corte (+) = CN - [(CN - CP) x 0,4]
- Punto de Corte (-) = CN - [(CN - CP) x 0,35]

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.

CÁLCULO DE % DE INHIBICIÓN (PIM):

$$PIM = \frac{DO \text{ Control neg.} - DO \text{ Muestra}}{DO \text{ Control neg.} - DO \text{ Control pos.}} \times 100$$

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

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) x 0,4] = 0,740
- Punto de corte (-) = 1,160 - [(1,160 - 0,110) x 0,35] = 0,792

Resultados:

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

KIT COMPOSITION

REAGENT	2 Plates		5 Plates		25 Plates	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5		25	
Vials with Positive Control	1	1,5mL	2	1,5mL	2	1,5mL
Vials with Negative Control	1	1,5mL	2	1,5mL	2	1,5mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	25mL	1	60mL	3	100mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	100mL	1	100mL	2	250mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL	5	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL	2	250mL
Bottles with Diluent (DE31)	1	60mL	1	60mL	1	250mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

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)

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.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used and never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C.
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 in aliquots at -20°C.

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 turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
- 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. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

PREPARATION OF SAMPLES

The sera sample needs to be at 1/2 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.

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 (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.

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 room temperature (20°C to 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 room temperature (20°C to 25 °C)**.
5. Wash 4 times following the procedure.
6. Add 100 µL of substrate, to each well. Keep the plate for **10-15 min at room temperature in a dark place**.
7. Add 100 µL of stop solution to each well.
8. Read the OD at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

TEST VALIDATION:

$$\frac{P}{N} < 0.3$$

- P= OD of positive control
- N= OD of negative control

Negative control's OD must be higher than 0.800

CUT OFF VALUES 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).

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.

INHIBITION PERCENTAJE CALCULATION (IPM)

$$IPM = \frac{OD\ CN - OD\ M}{OD\ CN - OD\ CP} \times 100$$

- IP ≥ 40: Sample positive to gE antibodies.
- IP ≤ 35: Sample negative to gE antibodies.
- 40 > IP > 35: Doubtful sample to gE antibodies.

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

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA
C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



CERTIFIED

MANAGEMENT SYSTEM
QUALITY - ISO 9001
ENVIRONMENTAL - ISO 14001

9191.INGE

9175.INGE

Distribuido en

Distributed in

por

by