



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.

Version Doc:27.05.2024

Nº de registro en España: 0809-RD

Registration number in Spain: 0809-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas (divisibles)		5 Placas (indivisibles)		10 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5		5		10	
Viales de Suero Control Positivo	1	2mL	2	2mL	1	2mL	1	2mL
Viales de Suero Control Negativo	1	2mL	2	2mL	1	2mL	1	2mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30mL	2	30mL	2	30mL	1	110mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE31-01), listo para usar	1	15mL	1	15mL	1	15mL	1	30mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL	1	60mL	1	120mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL	1	60mL	1	120mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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 50-250 mL.

Lector ELISA (filtro de 450 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO 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 él 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.

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

Se necesita añadir 80 µL de suero por pocillo.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (p.ej.: 40 mL de concentrado más 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 utilizarán como las muestras (80 µL/pocillo).

Preparación del Conjugado.

El conjugado se presenta listo para su uso.

PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C) antes de iniciar el ensayo.
2. 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 o 16-18 horas a 4°C**.
3. Lavar 3 veces con solución de lavado.
4. Añadir 100 µL/pocillo del conjugado. Tapar la placa e **incubar 30 minutos a 37°C**.
5. Lavar 5 veces con solución de lavado.
6. Secar bien y añadir 100 µL/pocillo del sustrato. **Incubar 10 minutos en oscuridad**.
7. Parar la reacción añadiendo 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 TEST:

- Abs 450 del C. Negativo debe ser mayor de 0,8
- Abs 450 del C. Positivo debe ser menor de 0,3

CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (PI)

$$PI = 1 - \left(\frac{M}{CN} \right) \times 100$$

Donde:

- M es la media de Abs 450 de la muestra.
- CN es la media de Abs 450 del Control Negativo.

INTERPRETACIÓN 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%.

EJEMPLO:

- Abs 450 CN = 1,360
- Abs 450 CP = 0,110
- Abs 450 Muestra 1 = 0,373
- Abs 450 Muestra 2 = 1,295

Validación:

- CN = 1,360 (> 0,8)
- CP = 0,110 (< 0,3)
- PI muestra 1 = [1 - (0,373/1,360)] x 100 = 72,5
- PI muestra 2 = [1 - (1,295/1,360)] x 100 = 4,7

Interpretación:

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

KIT COMPOSITION

REAGENT	2 Plates		5 Plates (divisible)		5 Plates (indivisible)		10 Plates	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5		5		10	
Vials with Positive Control	1	2mL	2	2mL	1	2mL	1	2mL
Vials with Negative Control	1	2mL	2	2mL	1	2mL	1	2mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL	2	30mL	1	110mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Bottles with Diluent (DE31-01), ready to use	1	15mL	1	15mL	1	15mL	1	30mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL	1	60mL	1	120mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL	1	60mL	1	120mL

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 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.

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

Serum samples and controls must be used without previous dilution adding 80 µL/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. When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

Conjugate:

The conjugate is ready to use.

Controls (+) y (-):

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

TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. 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**.
3. Wash 3 times following the described in Information on Washing Steps
4. Add 100 µL of conjugate to each well. Seal the plate and incubate for **30 minutes at 37°C**
5. Wash 5 times following the procedure.
6. Add 100 µL of substrate, to each well. Keep the plate for **10 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:

The test must be considered valid if:

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

INHIBITION PERCENTAGE (IP) VALUES CALCULATION:

$$IP = 1 - \left(\frac{M}{CN} \right) \times 100$$

Where:

- M = Mean of OD 450 nm of the sample.
- CN = Mean of OD 450 nm of Negative control.

RESULT INTERPRETATION:

- IP higher than 30%: **Positive** samples.
- IP lower than 30%: **Negative** samples.

PRACTICAL EXAMPLE:

- OD 450 CN = 1.360
- OD 450 CP = 0.110
- OD 450 Sample 1 = 0.373
- OD 450 Sample 2 = 1.295

Validation:

- CN = 1.360 (> 0.8)
- CP = 0.110 (< 0.3)
- IP sample 1 = $[1 - (0.373/1.360)] \times 100 = 72.5$
- IP sample 2 = $[1 - (1.295/1.360)] \times 100 = 4.7$

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).

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



Distribuido en	por
Distributed in	by