



INgezim® CSF COMPAC

Prod Ref: 11.CSF.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) en suero de cerdo.

Blocking immunoenzymatic assay for detection of antibodies to Classical Swine Fever virus (CSFV) in porcine serum.

Version Doc:27.05.2024

Nº de registro en España: 3848-RD

Registration number in Spain: 3848-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5	
Viales de Control Positivo	1	1mL	2	1mL
Viales de Control Negativo	1	1mL	2	1mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30mL	2	30mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL

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:

La placa de poliestireno lleva fijado el antígeno (proteína E2 del virus de la PPC). Se dispensan los sueros problema y los sueros control en los pocillos y después de un paso de lavado, un anticuerpo monoclonal (previamente marcado con peroxidasa) específico frente a la proteína E2. 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 el 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 al virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos.

El antígeno adsorbido a la placa se trata en este caso de la proteína viral E2 producida de manera recombinante y posteriormente purificada.

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 deben ser sueros porcinos (**no usar muestras muy hemolizadas o contaminadas; pueden dar falsos resultados positivos**). Para su uso en el kit, deberán diluirse 1/2 en el diluyente proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50 µL de diluyente y 50 µL de muestra.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (p.ej.: 40 mL de concentrado + 960 mL de H₂O). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

Sueros Control (+) y (-):

Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir para su ensayo deberá realizarse la dilución 1/2 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 µL de diluyente y 50 µL de control. Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante 1 mes entre +2°C y +8°C. Si se requiere alargar estos periodos, recomendamos distribuirlos en alícuotas y almacenarlos hasta su uso a -20°C.

Conjugado: Se presenta listo para su uso.

Atemperar y añadir 100 µL a cada pocillo.

PROCEDIMIENTO

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Si se realiza la dilución en el mismo pocillo, añadir en primer lugar 50 µL de diluyente y a continuación 50 µL de las muestras y controles. De este modo obtendremos una dilución de los sueros 1/2. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la mezcla, teniendo precaución de que no se produzca trasvase de unos pocillos a otros. Se recomienda ensayar controles por duplicado. Sellar la placa e **incubar 90 ± 5 minutos a 36 ± 1°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir en cada pocillo 100 µL de conjugado. Sellar la placa e **incubar 15 min a 36 ± 1°C**.
5. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µL de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción durante **10 minutos a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C)**.
7. Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL TEST:

Para que el test se considere válido, ha de cumplirse que el valor de DO media de los pocillos de control negativo sea al menos 4 veces el valor de DO media de los pocillos del suero control positivo:

$$\frac{\text{DO Control negativo}}{\text{DO Control positivo}} \geq 4$$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Si se están analizando las muestras por duplicado, se tomarán como valor de DO, la media de los valores obtenidos en ambos pocillos.

Para cada muestra se calculará su % de bloqueo de la siguiente manera:

$$\% = 100 - \left(\frac{\text{DO Muestra}}{\text{DO Control negativo}} \right) \times 100$$

- Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten % de bloqueo superior o igual al 35%.
- Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten % de bloqueo inferiores al 35%.

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials with Positive Control	1	1mL	2	1mL
Vials with Negative Control	1	1mL	2	1mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	125mL	1	125mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL

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

This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (**Blocking Elisa**). We make a brief description of the technique below: The antigen 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 (Mab) against the viral antigen coated to the plate (conjugated with peroxidase), it will compete with the antibodies of the serum. If the serum samples contain specific antibodies, they will not permit the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the Mab will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material from the plate, we can detect the presence or absence of labelled Mab 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 purified recombinant protein from the virus (the E2), which is the major structural protein from the CSFV and the most antigenic one.

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

Samples to be used in the assay must be porcine sera. **Do not use highly hemolyzed or contaminated samples. You might obtain false positive results.** To be assayed a 1/2 dilution must be done in the supplied diluent.

This dilution could be done directly on the plate by adding 50 µL of diluent and 50 µL of sera into each well.

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 (i.e., 40 mL of concentrate plus 960 mL of dH2O). When ready this solution remains stable between +2°C and +8°C until the expire date described at the label of the concentrated solution.

Control sera:

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

The control sera need to be diluted 1/2 in diluent prior to be used, in the same way than the sera samples (you can do the dilution directly into the plate by adding 50 µL of diluent plus 50 µL of control sera).

Conjugate: The conjugate is ready to use.

Bring to room temperature and add 100 µL/well.

TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature (20°C to 25°C) before use.
2. Add 50 µL of supplied diluent to each well. Add 50 µL of positive control sera to two wells (e.g., A1 and B1), and 50 µL of the negative control sera (e.g., A2 and B2). Add 50 µL of sera samples to test on each remainder wells. We recommend the use of two wells for each control. Seal the plate and **incubate for 90 ± 5 min at 36 ± 1°C**.
3. Wash 5 times as previously described.
4. Add 100 µL of specific conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 15 minutes at 36 ± 1°C**.
5. Wash 5 times as previously described
6. Add 100 µL of substrate to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**.
7. Add 100 µL of stop solution, to each well.
8. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

VALIDATION OF THE TEST:

The test could be considered valid when the OD of the Negative Control (NC) is, at least ,4 times higher than the OD of the Positive Control (PC):

$$\frac{\text{Negative control}}{\text{Positive control}} \geq 4$$

RESULTS INTERPRETATION:

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

Calculate the blocking % of each sample as follow:

$$\% = 100 - \left(\frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Negativo control}} \right) \times 100$$

- All samples with blocking % higher or equal than 35 must be considered Positive.
- All samples with blocking % lower than 35 must be considered Negative.

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



9191.INGE
9175.INGE

Distribuido en
Distributed in

por
by