



## INGEZIM MAEDI SCREENING

Prod Ref: 13.SLS.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a Lentivirus de pequeños rumiantes (MVV y CAEV) en sueros ovinos y caprinos.

Indirect immunoenzymatic assay for specific detection of serum antibodies to small ruminants Lentivirus (MVV and CAEV) in ovine and caprine samples.

Última revisión / Last revision: 24-01-17

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 3295 RD



Esta versión del protocolo ha sido modificada.

*Changes on the insert have been made.*

COMPOSICIÓN DEL KIT  
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Unid	vol	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listos para su uso Vials containing Positive Control sera ready to use	1	2.5 ml	2	2.5 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listos para su uso Vials containing Negative Control sera ready to use	1	2.5 ml	2	2.5 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) listo para su uso. Vials with conjugate ready to use (MAb peroxidase-conjugated)	1	30 ml	2	30 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos con diluyente (DE34-01), listos para su uso Bottles with diluent (DE34-01), ready to use	1	60 ml	2	60 ml
Frascos sustrato (ABTS) Bottles with substrate (ABTS)	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 405 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 (405 nm filter)

## I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

El virus de Maedi Visna (MVV) es un miembro del género lentivirus de la familia Retroviridae. Es una enfermedad viral que afecta a ovejas y ocasionalmente a cabras. Este virus está estrechamente relacionado con el virus de la artritis-encefalomielitis caprina (CAEV), lentivirus que se encuentra con más frecuencia en cabras. Ambos virus comparten muchas características, y con frecuencia se consideran en conjunto como los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV). Recientemente se ha demostrado la recombinación entre MVV y CAEV. Los SRLV pueden clasificarse en genotipo A, que incluye al virus de Maedi Visna y el genotipo B asignado al virus de CAEV.

Nuestro kit es capaz de detectar anticuerpos específicos de ambas enfermedades MVV y CAEV mediante el empleo de péptidos específicos de

ambos genotipos (A y B) y se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto, que se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el preparado de péptidos de los genotipos A y B específicos de MVV y CAEV respectivamente.

Cuando sobre la placa se dispensan los sueros problema, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos quedarán adheridos a los péptidos de la placa. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, puede revelarse la presencia de inmunoglobulinas ovinas o caprinas mediante un conjugado de peroxidasa específico, que al reaccionar con el sustrato adecuado producirá una reacción colorimétrica

## 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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. ¡IMPORTANTE! Tanto el sustrato como el tampón sustrato son extremadamente sensibles a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente los volúmenes que se vayan a utilizar.
11. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.

## III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C. y +8°C. La solución de frenado puede precipitar a estas temperaturas, por lo que se recomienda, antes de utilizar, calentar a 37°C para disolver el precipitado.

## 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:

## INGEZIM MAEDI SCREENING 13.SLS.K1

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente 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.
- Antes de eliminar el contenido del último 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:

Utilizar los sueros a la dilución 1/20 (p.ej.10 µl de suero en 190 µl de diluyente)

### VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Solución de lavado:**

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrada más 960 ml de agua).

- **Preparacion de controles y conjugado:**

El conjugado y los controles se presentan listos para su uso, **no diluir**

- **Solución sustrato:**

Viene lista para usar

### VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones de suero a testar (preparado según instrucciones anteriores). Añadir a continuación 100 µl de los controles. Recomendamos la realización de los controles por duplicado Tapar la placa e incubar **45 min ± 2 min a 37°C**
3. Lavar 3 veces según procedimiento anterior.
4. Añadir 100 µl del Conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar a **30 min ± 2 min a 37°C..**
5. Lavar 3 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de solución sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción durante **15 minutos a temperatura ambiente.**
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
 

**¡ATENCIÓN! La solución de frenado puede formar espuma. Evitar dispensar burbujas sobre la placa ya que podría interferir en la lectura de los resultados.**
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 405 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realiza a una longitud de onda de **405 nm**.

### A. Validación del ensayo:

El kit se considerará válido cuando:

La Abs media a 405nm del Control (+) es > 0.6  
La Abs media a 405nm del Control (-) es < 0.2

### B. Cálculo del índice de positividad (M/P):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

### C. Puntos de corte

Se considera una muestra como positiva si su índice M/P es > 0.45

Se considera una muestra como negativa si su índice M/P es < 0.40

Todos los sueros cuyos índices M/P sean iguales o se encuentren entre ambos valores se considerarán como dudosos y se recomienda sean testados de nuevo por el ensayo de confirmación (INGEZIM MAEDI CONFIRMACIÓN) Así mismo, se recomienda la utilización del ensayo de confirmación con todos los sueros positivos con M/P iguales o inferiores a 0.6

Para calcular el índice M/P realizar la siguiente operación

$$M/P = \frac{(\text{Abs}405 \text{ nm Muestra}) - (\text{Abs}405\text{nm C. neg})}{(\text{Abs } 405\text{nm C pos}) - (\text{Abs } 405\text{nm C neg})}$$

---

## I. TECHNICAL BASIS

Maedi Visna Virus (MVV) is a member of the genus lentivirus of the family Retroviridae. It is a viral disease that affects sheep and goats occasionally. This virus is closely related to the of the caprine arthritis-encephalomyelitis virus (CAEV), a lentivirus, occurring most frequently in goats. Both viruses share many characteristics, and often are considered altogether the lentivirus of small ruminants (SRLV). The SRLV can be classified in A genotype, which includes the Maedi Visna Virus and genotype B assigned to the CAEV. Our kit is capable of detecting specific antibodies of both MVV and CAEV diseases using specific peptides of both genotypes (A and B) and is based on the technique of indirect enzyme

immunoassay, which is described briefly below. On a solid support (polystyrene plate), the preparation of peptides of the genotypes A and B specific MVV and CAEV respectively is adsorbed.

When on the plate the serum sample is dispensed in the case of containing specific antibodies, these will be attached to the plate peptides. After successive washes to remove material not bound, the presence of ovine or caprine immunoglobulins can be detected through the addition of a specific peroxidase-conjugate, which will produce a colorimetric reaction in the presence of the appropriate substrate

---

## II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use 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.
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 handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
10. Substrate and substrate buffer must be handle with care, they are very sensible to light and contamination.

---

## III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C.

**WARNING:** Stop Solution may precipitate at this temperature, if it happens, warm up at +37°C before use

---

## 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:

Make the 1/20 dilution of each sample (i.e. 10 µl of serum and 190 µl of diluent)

## VI. 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 concentrated solution and 960 ml of water). When ready this solution remains stable stored between 2°C and 8°C.

- **Preparation of controls and conjugate:**

Controls and conjugate are ready to use. **Do not dilute.**

- **Preparation of the substrate solution: to make immediately before use.**

It is ready to use. Do not dilute.

## VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to bring room temperature before use.
2. Add samples diluted as it's specified in the previous instructions. Add 100 µl of Positive and Negative control serum to their respective wells We recommend to run controls in duplicate wells. **Incubate the plate for 45 min ± 2 min at 37°C**
3. Wash 3 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate to each well and **incubate the plate for 30 min ± 2 min at 37°C.**
5. Wash 3 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **405 nm**.

$$S/P = \frac{OD_{405} \text{ Sample} - OD_{405} \text{ C (-)}}{OD_{405} \text{ C (+)} - OD_{405} \text{ C (-)}}$$

### A. Validation criteria:

The test is considered valid when:  
Mean OD of the positive control is > 0.6  
Mean OD of the negative control is < 0.2

### B. Positivity index calculation (S/P):

If you run samples in duplicate, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values.

To obtain S/P of the sample:

### C. Results Interpretation:

Samples with S/P higher than 0.45 will be considered as Positives.

Samples with S/P lower than 0.40 will be considered as Negatives.

Samples with S/P equal or between both values must be considered as doubtful. We recommend to use the confirmation assay (INGEZIM MAEDI CONFIRMACIÓN) with doubtful and weak positive sera (S/P<0.6)

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)  
Tlf: +34 91368.05.01/04  
Fax: +34 91 408.75.98  
E-mail: ingenasa@ingenasa.com  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)

Distributed in by:

