



# INGEZIM MAEDI CONFIRMATION

Prod Ref: 13.SLC.K1

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

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

Última revisión / Last revision: 06-03-17  
Nº registro en España / Spanish registration number: 3299-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT  
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	4 Placas (T) 4 strip Plates	
	Unid	vol
Placas tapizadas con antígeno positivo (columnas impares) y antígeno negativo (columnas pares) divididas en 6 tiras de 16 pocillos (6 x 16) Plates coated with positive antigen (odd columns) and negative antigen (even columns) divided in 6 double strips (6 x 16)	4	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listos para su uso Vials containing Positive Control serum, ready to use	1	4 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listos para su uso Vials containing Negative Control serum, ready to use	1	4 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) listo para su uso. Vials with conjugate (MAb peroxidase conjugated), ready to use	1	45 ml
Fascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml
Fascos con diluyente (DE-34), listos para su uso Bottles with diluent (DE-34), ready to use	1	125 ml
Fascos sustrato (ABTS) listo para usar Bottles with substrate (ABTS) ready to use	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	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-encefalitis 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.

Este kit se ha diseñado para confirmar los resultados positivos obtenidos en el kit de screening. Para ello, además de detectar anticuerpos específicos de ambas enfermedades MVV y CAEV mediante el empleo de péptidos específicos de ambos genotipos (A y B), se ha incluido placas con antígeno negativo. La técnica es la del inmunoensayo enzimático indirecto, que se describe brevemente a continuación.

Sobre una placa de poliestireno, se fija el preparado de péptidos de los genotipos A y B específicos de MVV y CAEV respectivamente. Sobre otra placa (roja) se fija el péptido negativo.

Cuando sobre las placas se dispensan los sueros problema, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos quedarán adheridos a los péptidos de la placa positiva. En caso de contener anticuerpos de unión inespecífica, estos quedarán unidos tanto a la placa positiva como a la negativa. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, la presencia de inmunoglobulinas ovinas o caprinas se revela mediante un conjugado de peroxidasa específico, que al reaccionar con el sustrato adecuado producirá una reacción colorimétrica. La resta entre los valores obtenidos en la placa positiva y negativa determinará si los anticuerpos son específicos o no de lentivirus.

## 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:

- 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.15 µl de suero en 285 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). Una vez preparada permanece estable a +4°C
- **Preparación de controles y conjugado:**  
El conjugado y los controles se presentan listos para su uso, no diluir
- **Solución sustrato:**  
El sustrato se presenta listo para su uso. No diluir.

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **IMPORTANTE: Todas las muestras han de ensayarse tanto en los pocillo con antígeno viral (columnas impares) como en los pocillos de antígeno negativo (columnas pares).** 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, aunque no es obligatorio, la realización de los controles por duplicado (dos con antígeno positivo y dos con antígeno negativo). Tapar la placa e incubar **45 min ± 2 min a 37°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito.
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**.

Los resultados serán los que se obtengan de restar el valor obtenido en el pocillo negativo del obtenido en el pocillo positivo.

---

### A. Validación del ensayo:

---

El kit se considerará válido cuando:

La resta de la DO Control (+) de pocillo positivo menos la del pocillo negativo es  $\geq 0.6$

La resta de la DO del Control (-) de pocillo positivo menos la del pocillo negativo es  $\leq 0.2$

---

### B. Cálculo del índice de positividad :

---

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

Para calcular el índice realizar la siguiente operación

$$(\text{DO Muestra pocillo (+)} - \text{DO Muestra pocillo (-)}) \times 100$$

---

### C. Puntos de corte

---

Se considera una muestra como positiva si su índice es  $\geq 25$

Se considera una muestra como negativa si su índice es  $< 25$

## I. TECHNICAL BASIS

The Maedi Visna Virus (MVV) is a member of the genus Lentivirus of the Retroviridae family. It is a viral disease that affects sheep and occasionally goats. This virus is closely related to the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), a Lentivirus, more frequently found in goats. Both viruses share many characteristics, and are often considered altogether as small ruminants lentiviruses (SRLV). The SRLV can be classified in genotype A, which includes the Maedi Visna virus and in genotype B assigned to the CAEV.

This assay has been designed to confirm the positive samples obtained in the screening test (13.SLS.K1). Therefore, in addition to the detection of specific antibodies to both MVV and CAEV through the use of specific peptides of both genotypes (A and B), the kit provides plates coated with negative antigen. The assay is based on an indirect

enzyme immunoassay technique, which is briefly described below.

A preparation of peptides of the genotypes A and B, specific to MVV and CAEV respectively, are adsorbed on a polystyrene plate. On another plate (red plate) the negative peptide is fixed. After adding a serum sample on both plates, in the case of containing specific antibodies, these will be attached to the positive plate. If the antibodies are non-specific they will attach to the positive and to the negative plate. After several washing steps to remove any unbound material, the presence of ovine or caprine immunoglobulins can be detected by the addition of a specific peroxidase-conjugate, which will produce a colorimetric reaction in the presence of an appropriate substrate. The subtraction of the values obtained in both plates will determine whether the antibodies are specific to lentivirus or not.

## 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 reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit's reagents.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different batches.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
10. The substrate and the substrate buffer must be handled with care, as they are very sensitive 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 it up at +37°C before use

## IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING PROCEDURE

The washing of the plates can be done using an automatic plate washer, a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µL on each well, or a squeeze bottle.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

## V. PREPARATION OF SAMPLES:

Dilute the samples at 1/20 dilution (i.e. 15 µl of serum and 285 µl of diluent)

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**  
Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of concentrated solution and 960 ml of water). Once prepared this solution remains stable when stored between at +.
- **Preparation of the substrate solution**  
Substrate is ready to use. Do not dilute.
- **Preparation of controls and conjugate:**  
Do not dilute. Controls and conjugate are ready to use.

## VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C).
2. **IMPORTANT: All samples must be assayed in the positive and the negative wells.** Add the samples diluted as specified in the previous instructions. Then add 100 µl of the Positive and Negative control serum to their respective wells. We recommend (no mandatory) running controls in duplicate in both wells. **Incubate the plate for 45 min ± 2 min at 37°C.**
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
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 procedure previously described.
6. Add 100 µl of the substrate to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of the stop solution to each well.
8. Read the absorbance of each well with a spectrophotometer at 405 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

The values obtained in the negative wells must be subtracted from the values obtained in the positive wells

### A. Validation criteria:

The test is considered valid when:

The OD of the positive control in the positive well minus the OD in the negative well is  $\geq 0.6$

The OD of the negative control in the positive well minus the OD in the negative well is  $\leq 0.2$

### B. Positivity index calculation

To obtain the index of the sample:

$$(\text{OD Sample of pos. well} - \text{OD sample of neg. well}) \times 100$$

### C. Results Interpretation:

Samples with an index  $\geq 25$  must be considered as Positive to SRLV antibodies.

Samples with an index  $< 25$  will be considered as Negative to SRLV antibodies.

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)



IT-73840  
IT-73780

ISO 14001:2015  
9191.INGE

ISO 9001:2015  
9175.ING2

Distributed in

by:

