



INGEZIM ANEMIA EQUINA

Prod Ref: 14.AIE.K0

Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento para la detección en suero de anticuerpos frente al virus de la Anemia Infecciosa Equina

Double recognition enzymatic immunoassay for detection of antibodies in serum specific for Equine Infectious Anemia virus

Última revisión / Last revision: 27-05-13
Registrado por el MAPYA nº: 2340 RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	2	-
Viales de suero Control Positivo Vials of Positive Control serum	1	1.5 ml
Viales de suero Control Negativo Vials of Negative Control serum	1	1.5 ml
Frascos de Conjugado listo para su uso (rp 26-HRPO) Bottles with Conjugate ready to use (rp 26-HRPO)	1	30 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente (DE01-01) a la dilución de uso Bottles with serum diluent (DE01-01) ready to use	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	30 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 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 450 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 (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al virus de la Anemia Infecciosa Equina (AIE), siendo capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero de animales infectados. La base técnica del kit, es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) denominado de doble reconocimiento, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de EIAV, en este caso la proteína recombinante P26. Cuando se añaden las

muestras de suero, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo la proteína P26 pero conjugada con peroxidasa. En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, muchos de ellos serán capaces de capturar la P26-peroxidasa a la vez que permanecen unido a la P26 fijada en los pocillos. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

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. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al bote el sustrato sobrante.

III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada. **Una vez abiertos**, 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 para posteriores utilizaciones.

IV. 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:

- Σ Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Σ Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Σ Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos
- Σ Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.

INGEZIM ANEMIA EQUINA

14.AIE.K0

- | | |
|--|--|
| <p>Σ Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.</p> <p>Σ Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.</p> | <p>Σ Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.</p> |
|--|--|

V. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución de lavado concentrada 25 x:**
Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado en 960 ml de agua destilada). Una vez preparada es estable entre +2°C y +8°C.
- **Sueros Controles:**
Tratarlos del mismo modo que a las muestras.
- **Preparación del conjugado:**
Se presenta listo para su uso.

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar una dilución 1/2 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50 µl de diluyente y luego 50 µl de la muestra. Agitar suavemente la placa para una correcta homogeneización de la mezcla.

ATENCIÓN: LAS MUESTRAS HEMOLIZADAS O EN MAL ESTADO PUEDEN DAR FALSOS RESULTADOS

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros y controles:**
 - Añadir 50 µl de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar. Añadir a continuación 50 µl de los sueros problema a ensayar. Añadir en último lugar 50 µl de los controles positivo y negativo (por duplicado).
 - Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable aunque no necesario valorar las muestras por duplicado.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar de nuevo 1 hora a 37°C.
5. Lavar 3 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).

7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

1. VALIDACIÓN DEL TEST

DO del Control Positivo > 0.8

DO del Control Negativo/DO control positivo < 0.15

2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Calcular la relación **DO muestra/DO control+ (M/P)**.

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a EIAV), cuando su M/P sea mayor ó igual de 0.3

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a EIAV), cuando su M/P sea menor de 0.3

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed to detect antibodies specific for Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) in horses being able to detect a very low titters of antibodies in sera of infected animals.

The INGEZIM EIA DR kit is based on a double recognition ELISA which is described below:

Plates are coated with recombinant P26 protein of EIAV. After adding the sample to the well, if it contains EIAV specific antibodies, they will bind to

the antigen coating the plate while if the sample does not contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

When P26 protein conjugated with peroxidase is added and sera samples contain P26 specific antibodies, they will catch the labelled P26 while they are fixed to the antigen coated in the well. Presence or absence of labelled P26 will be detected by addition of substrate (TMB) which, in presence of the peroxidase, will develop a colorimetric reaction.

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 of the Kit.
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. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C. **Once opened**, 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 at -20°C.

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 REAGENTS

• Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water (i.e. 40 ml of concentrate and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

▪ Positive and Negative controls:

Controls must be tested as the samples (adding 50µl diluent + 50 µl control)

▪ Preparation of the conjugate:

Conjugate is ready to use and must be used adding 100µl/well

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be assayed diluted 1/2in diluent. This dilution could be made directly on the assay plate by adding 50µl of diluent and 50 µl of sample to each well. **ATTENTION: HAEMOLYZED OR CONTAMINATED**

SAMPLES MAY GIVE FALSE RESULTS

VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 50 µl of diluent to each well. Add 50 µl of each sample to be assayed and then, 50 µl of positive and negative control. We recommend running controls in duplicate wells. For confirmatory purposes is recommended but not mandatory to run samples in duplicate wells Seal the plate and incubate 1 hour at 37°C.
- Wash 3 times following the described procedure.
- Add 100 µl of conjugate ready to use to each well. Seal the plate and incubate for 1 hour at 37°C.
- Wash 3 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for 15 min at room temperature.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

If you run samples and controls in duplicate wells calculate the mean OD of both wells.

1. VALIDATION OF THE TEST

OD of Positive Control > 0.8

OD Negative Control/ OD Positive Control < 0.15

2. RESULTS INTERPRETATION

Calculate the relation OD of sample/OD of positive control (S/P).

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific of EIAV), if the S/P value is higher or equal than 0.3.

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for EIAV in the sample) if the S/P value is lower than 0.3.

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

Distributed in

by:

