



INGEZIM AHSV COMPAC PLUS

Prod Ref: 14.AHS.K3

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)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



Distributed in _____ by:

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo,
específico para la detección de
anticuerpos frente al virus de la *Peste
Equina Africana* en sueros de équidos.

Blocking immunoenzymatic assay, for
detection of specific antibodies to African
Horsesickness Virus in equine sera.

Última revisión / Last revision: 06-03-14
Registrado en España con nº: / Registered in Spain with nº: 1390 RD



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 listo para usar Vials containing Positive Control sera ready to use	1	2,5 ml	2	2,5 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listo para usar 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 usar 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 conteniendo diluyente listo para usar (DE01-01) Bottles containing diluent ready to use (DE01-01)	1	125 ml	2	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (ABTS). Bottles containing substrate (ABTS).	1	30 ml	1	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. (SDS) Bottles containing stop solution. (SDS)	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 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)

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit in 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of concentrate solution and 960 ml of water). Once this solution is ready, it remains stable between +2°C and +8°C.
- **Preparation of conjugate:**
Conjugate is ready to use and does not need any preparation.
- **Preparation of substrate:**
Ready to use
- **Preparation of Controls (+) y (-):**
Controls are ready to use and do not need any preparation. Dispense 100 µl of each one.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be brought to room temperature before use.
2. Dispense 100 ul of diluted samples into appropriate wells (dilution 1/5). We recommend running the samples in duplicate. Dispense 100 ul of positive control into two wells and 100 ul of negative control into two wells. Cover the plate and **incubate for 1 hour at 37°C.**
3. Wash 5 times as described before
4. Add 100 ul/well of conjugate. **Incubate for 30 minutes at 37°C.**
5. Wash 5 times as described before.
6. Dispense 100 ul/well of substrate using a multichannel pipette. **Incubate for 10 minutes at room temperature.**
7. Dispense 100 ul/well of stop solution. Take care to avoid dispensing of bubbles.
8. Read at 405nm 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.**

A. Validation criteria:

- The OD of the Positive control must be lower than 0.2
- The OD of the Negative control must be higher than 1.0

B. Interpretation:

Determine the Blocking Percentage (BP) of each sample applying the following formula:

$$BP = \frac{\text{Abs}(\text{Control -}) - \text{Abs}(\text{sample})}{\text{Abs}(\text{Control -}) - \text{Abs}(\text{Control +})} \times 100$$

D. Example

Average Abs Positive Control = 0,110
Average Abs Negative Control = 1,859
Abs sample = 0,865

$$BP = \frac{1,859 - 0,865}{1,859 - 0,110} \times 100 = 56,8$$

Sample is positive.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (Blocking Elisa). A brief description of the technique is shown below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). After incubation with sera samples, an AHSV specific monoclonal antibody (Mab peroxidase conjugated) is added. If the sample contains antibodies specific of the virus, they will not allow the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies, the Mab will bind to the antigen coating the plate.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, presence or absence of labelled Mab can be detected by adding the substrate which, in presence of the peroxidase, will develop a colorimetric reaction.

If there has been colour development, the conjugate has bound to the antigen, being the sample negative. On the other hand, if there are antibodies specific of AHSV in the sample, they will block the binding of the conjugate and there will not be colour development. The antigen used in this kit is VP7 recombinant protein from the AHSV (serotype 4) obtained using the baculovirus expression system. This confers many advantages to the assay. From the safety point of view, it is clear the total absence of infectivity. From the accuracy point of view, VP7 is one of the mayor proteins from AHSV, as well as the most antigenic one and the most conserved within the 9 different serotypes. It has not been found any infected or vaccinated animal without antibodies to this protein.

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 kit's reagents.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. Do not eat, drink, or smoke 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 use of the kit, control positive and negative must be tested in a systematic way.
10. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.
11. Stop solution can precipitate at refrigeration. Be sure there is not precipitation before use

III. STORAGE OF COMPONENTS

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

The stop solution precipitates at this temperature. Incubate at 37°C before use, to eliminate the precipitation.

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:

Sera samples must be diluted 1/5 in the provided diluent. This step can be made directly in the wells of the plate by adding 80 µl of diluent and 20 µl of serum sample and shaking carefully the plate to homogenize it.

I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de **ELISA de bloqueo**, que se describe brevemente a continuación:
Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno viral. Sobre él se dispensan los sueros problema que, en caso de ser positivos y poseer anticuerpos específicos se unirán a él. Tras un paso de lavado para eliminar el material no fijado se añade un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa (AcM) específico del antígeno viral. En caso de que la muestra problema contenga anticuerpos estos "ocuparán" el epítipo del AcM y este último no podrá unirse al antígeno. En caso de una muestra negativa el AcM se unirá sin ningún problema y quedará fijado al pocillo. Tras realizar una serie de lavados para eliminar el material no adherido, se procederá a revelar la presencia o no del anticuerpo monoclonal mediante la adición de un sustrato adecuado a la peroxidasa que en presencia de esta dará lugar a una reacción coloreada que se mide en un lector de placas ELISA.

La interpretación de la lectura, será como sigue: Si aparece color, significará que lo que se ha adherido al antígeno de la placa es el anticuerpo monoclonal y por lo tanto nuestro suero problema será negativo para esta patología. Por el contrario, la ausencia de color indicará que los anticuerpos unidos al antígeno son del suero problema por lo que ha de considerarse positivo. El antígeno adsorbido a la placa se trata en este caso de la proteína estructural VP7 del VPEA, (serotipo 4) producida de forma recombinante en el sistema de baculovirus, por lo que carece totalmente de infectividad. La VP7 es una de la proteína mayoritarias del virus y la de mayor poder antigénico, no habiéndose encontrado hasta el momento caballo infectado o vacunado que no presente anticuerpos contra esta proteína. La VP7 es además la proteína común de serogrupo lo que le confiere a este kit la capacidad de detectar animales positivos sea cual sea el serotipo viral causante de la infección.

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.
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! 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.
11. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado conservada en refrigeración, podría precipitar. Asegurarse de que antes de su utilización, desaparece la precipitación.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Las placas y el resto de los componentes deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

La solución de frenado puede almacenarse a temperatura ambiente. Cuando se conserva en refrigeración, puede producirse la precipitación de sus componentes. Si esto sucediese, bastará con mantener la solución a 37°C unos minutos antes de su utilización.

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 brusquemente 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 brusquemente 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:

Diluir las muestras 1/5 en diluyente
Para mayor comodidad, esta dilución se puede hacer en el propio pocillo (80 µl de diluyente más 20 µl de suero)

siempre y cuando luego se agite bien la placa para la correcta homogeneización de la muestra.

VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- Solución de lavado:**
Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit con 24 partes de agua destilada. (40 ml de concentrado 25x más 960 ml de agua destilada). Una vez diluida, la solución permanece estable entre +2°C y +8°C
- Preparación de controles (+) y (-):**
- Preparación del conjugado:**
El conjugado se presenta listo para su uso y no necesita preparación alguna
- Preparación de sustrato:**
Listo para usar
- Los controles se presentan listos para su uso y no necesitan preparación alguna. Añadir 100 µl / pocillo

VII. PROCEDIMIENTO

- Antes de comenzar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
- Dispensar 100µl de las muestras diluidas tal como se especifica con anterioridad. Añadir en último lugar 100 µl de los controles. Para una mejor realización del ensayo recomendamos que tanto las muestras como los controles sean ensayados por duplicado. **Tapar la placa e incubar 1 hora a 37°C.**
- Lavar 5 veces siguiendo las instrucciones descritas anteriormente
- Añadir 100 µl de conjugado a cada uno de los pocillos.
Tapar la placa e incubar 30 minutos a 37°C.
- Lavar 5 veces siguiendo las instrucciones descritas anteriormente.
- Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo de la placa. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. **Mantener la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.**
- 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 contiene detergente y puede formar espuma. Tomar la precaución de no distribuir burbujas sobre la placa ya que podría interferir la lectura de los resultados.
- Leer en espectrofotómetro a 405nm de longitud de onda en los siguientes 5 minutos tras 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**. Se tomará como resultado la media aritmética de las absorbancias de los dos pocillos de cada una de las muestras (en caso de hacer duplicado).

A. Validación del test:

El test se considerara válido cuando:

- DO Control - > 1
- DO Control + < 0.2

B. Interpretación

Determinar el porcentaje de Bloqueo (PB) de cada muestra según la fórmula siguiente:

$$PB = \frac{\text{Abs}(\text{Control -}) - \text{Abs}(\text{muestra})}{\text{Abs}(\text{Control -}) - \text{Abs}(\text{Control +})} \times 100$$

- Los sueros cuyo valor de PB sea superior al **50%** se consideran positivos a peste equina.
- Los sueros con valor de PB inferior al **45%** se considerarán negativos.
- Los sueros cuyo valor de PB queden entre el 45% y el 50% se considerarán dudosos y se recomienda valorar de nuevo transcurridas 2 semanas.

C. Ejemplo

Media aritmética Abs Control + = 0,110
Media aritmética Abs Control - = 1,859
DO muestra = 0,865

$$PB = \frac{1,859 - 0,865}{1,859 - 0,110} \times 100 = 56,8$$

La muestra es positiva.