



INGEZIM PEA DAS

Prod Ref: 14.PEA.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección de antígeno del *virus de la Peste Equina Africana* en muestras biológicas.

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for African Horsesickness Virus antigen detection in biological samples.

Última revisión / Last revision: 30-06-15
Registrado en España con nº: / Registered in Spain with nº: 427RD



Esta versión del protocolo
ha sido modificada.

*Changes on the
insert have been
made.*

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	1 Placa 1 Plate	
	Unid	vol
Placa de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plate divided in strips (12 x 8)	1	-
Viales conteniendo Control Positivo listo para su uso Vials containing Positive Control ready to use	1 vial	2,5ml
Viales conteniendo Control Negativo listo para su uso. Vials containing Negative Control. Ready to use.	1 vial	2,5ml
Viales conteniendo conjugado I (AcM marcado con biotina) concentrado 100x. Vials with conjugate I 100x concentrated (MAb biotin conjugated)	1 vial	300 µl
Viales conteniendo conjugado II (Estreptavidina-peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate II 100x concentrated (Streptavidin-peroxidase)	1 vial	300 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente listo para su uso (DE01-01) Bottles containing diluent ready to use (DE01-01)	2 frasco	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (ABTS). Bottles containing substrate (ABTS).	1 frasco	30 ml
Frascos conteniendo solución de frenado (SDS) Bottles containing stop solution. (SDS)	1 frasco	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

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (ELISA-DAS). Esta técnica presenta grandes ventajas frente al resto de las citadas con anterioridad: mayor índice de sensibilidad, especificidad, rapidez y fácil automatización.

Brevemente esta técnica consiste en tapizar los pocillos de una placa con anticuerpos específicos frente al VPEA. Sobre esta placa tapizada se añaden las muestras a ensayar, incubándose durante 1h. Durante la incubación, el virus presente en las muestras será capturado por el anticuerpo específico

fijado en la placa. Transcurrido este tiempo, se procederá a eliminar mediante lavados el material no capturado por el anticuerpo. Para revelar la presencia o ausencia de virus capturado se añadirá otro anticuerpo específico frente a VPEA conjugado con biotina. Tras eliminar el resto del material no unido mediante lavado de la placa y añadir un segundo conjugado, marcado con peroxidasa (Streptavidina-PO), se procederá a revelar la reacción con un sustrato específico de este último enzima, el ABTS. La presencia de color indicará por tanto la existencia de virus en la muestra.

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. El sustrato es 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

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.

La solución de frenado precipita a esta temperatura. Antes de usar calentar a 37°C para eliminar 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:

Cualquier clase de muestra biológica puede ser ensayada en este kit. Pero recomendamos la utilización de bazo.

Preparar una dilución 1/2 (W/V) de la muestra, utilizando el diluyente suministrado. (Por ej. 1 g de muestra en 2 ml de diluyente).

Para la óptima homogenización de la muestra, usar un stomacher u otro dispositivo mecánico. Después centrifugar a 1000 pm, durante 10 minutos.

Se recogerá el sobrenadante que será utilizado como muestra de ensayo.

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 (-) :**
Los controles se presentan a la dilución de uso. Añadir 200 µl / pocillo sin diluir.
- **Preparación del conjugado de biotina: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar una dilución 1/100 en diluyente (20 µl de conjugado hasta 2 ml de diluyente es suficiente para una tira de 8 pocillos). Homogeneizar bien la solución antes de su utilización.
- **Preparación del conjugado de peroxidasa: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar una dilución 1/100 en diluyente (20 µl de conjugado hasta 2 ml en diluyente el la cantidad necesaria para 8 pocillos). Homogeneizar bien la solución antes de su utilización.

Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha ser desechada.

ATENCIÓN: preparar conjugado inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.
- **Preparación sustrato:**
Listo para usar

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto los conjugados) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 200 µl de control positivo, en el primer pocillo, 200 µl de control negativo en el segundo pocillo y 200 µl de cada muestra a testar en cada uno de los pocillos restantes. **Tapar la placa e incubar a 1 h a 37°C.**
3. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0.1M y lavar 4 veces según procedimiento anterior.
4. Añadir 200 µl de conjugado biotina preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa **en incubar a 1 h a 37°C.**
5. Lavar 5 veces según procedimiento anterior.
6. Añadir 200 µl de conjugado de peroxidasa preparado según instrucciones anteriores en cada pocillo. **Incubar 45 minutos a temperatura ambiente (25°C).**
7. Lavar 5 veces más según procedimiento anterior.
8. Añadir 200 µl de sustrato a cada pocillo. **Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.**
9. Añadir 50 µl de solución de frenado a cada pocillo.
10. Leer 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**.

$$\text{DO corregida} = \text{Abs 405 Muestra} - \text{Abs405 Control Negativo}$$

A. Validación del test:

El test se considerara válido cuando la D.O. del control (+) sea mayor que 2.0.

B. Cálculo de DO corregidas:

El valor de cada muestra será el resultado de restar a la D.O. de la muestra la D.O del control (-).

C. Interpretación de resultados

Una vez determinado el valor corregido de cada muestra se consideran **POSITIVAS** aquellas mayores de 0,20 y **NEGATIVAS** las inferiores a 0,15

Las muestras que presenten valores entre 0,15 y 0,20 se considerarán dudosas, recomendándose su ensayo utilizando una técnica diferente.

IX. AVISO IMPORTANTE:

Este ensayo ha sido únicamente probado en bazos de serotipo 4. El resto de serotipos han sido probados en sobrenadante de cultivos celulares.

INGEZIM PEA DAS 14.PEA.K2

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a double antibody sandwich enzymatic immunoassay (DAS or capture Elisa). We make a brief description of the technique below:

The plate is coated with a specific antibody to vp7 of the AHSV. In this way when a sample is added into the wells, if it contains antigen, the antibodies

will catch it. After incubation and washing a biotin-conjugated antibody to vp7, is added. If there is antigen captured into the well, the biotin conjugate will bind to it. After incubation and washing you add a second conjugate (Streptavidin peroxidase conjugated) and the peroxidase action will be detected after adding the adequate 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 kit's 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 must be handled with care, it is very sensitive 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 is precipitated at this temperature. Incubate at 37°C before using, 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:

Any kind of biological samples could be assayed in this kit. Nevertheless, for diagnosis purposes, we recommend to use the **spleen**

To prepare the sample, 1/2 dilution must be done (w/v) using the diluent supplied (i.e. 1g of

sample in 2 ml of diluent). For optimal homogenisation of the sample use a stomacher or any other mechanic device. After that, centrifuge at 1000 rpm for 10 minutes and take the supernatant for testing.

VI. 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 (40 ml of concentrate solution and 960 ml of water). Once this solution ready, it remains stable between +2°C and +8°C.
- **Controls:**
Controls are ready to use. (Add 200 µl / well)
- **Preparation of the conjugates: to make immediately before use.**

Dilute the needed quantity of conjugates provided in the kit 1/100 with diluent (e.g. 20 µl of conjugate into 2 ml of diluent is enough quantity for one strip of 8 wells). Shake the solution before use.

ATTENTION: Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

- **Preparation of the substrate:**
Ready to use.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugates) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 200 µl of positive control to one well (e.g. A1), and 200 µl of the negative control to other well (e.g. A2). Add 200 µl of samples to test on each remainder wells. We recommend the use of two wells per sample. Seal the plate and incubate **for 1 h at 37°C**.
3. **Empty the wells into a receptacle containing 0.1M NaOH** and wash four times as it is specified at point IV.
4. Add 200 µl of biotin conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 200 µl of peroxidase conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 45 minutes at room temperature (20-25°C)**.
7. Wash 5 times following the described procedure.
8. Add 200 µl of substrate solution, prepared following previous instruction, to each well. **Keep the plate for 10 minutes at room temperature.**
9. Add 50 ul/well of stop solution
10. Read a 405 nm within 5 min after the addiction of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

A. Validation criteria:

The test will be considered valid when:

- The OD of the Positive control is higher than 2.0

B. Results Interpretation:

If sera are assayed in duplicates, OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD

values in both wells. The corrected OD value should be calculated for each sample:

Corrected OD = Sample OD – Negative Control OD

- Samples with a corrected OD higher than 0.200 must be considered as **POSITIVE** to AHSV.
- Samples with corrected OD lower than 0,150 must be considered as **NEGATIVE** to AHSV.
- Samples with OD values between both values are considered as **DOUBTFUL**. We recommend re-testing these animals applying a different technique.

IX. IMPORTANT NOTE:

This assay has been checked with spleen only for serotype 4. The rest of serotypes have been checked with cell culture supernatants.

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



Distributed in

by: