



INGEZIM ARTERITIS 2.0

Prod Ref: 14.EA2.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección de anticuerpos frente al virus de la *arteritis equina* en suero de equidos

Indirect enzymatic immunoassay for the detection of specific antibodies to Equine Arteritis Virus (EAV) in horse serum

Última revisión / Last revision: 04-12
Registrado en España con nº: / Registered in Spain with nº: 0606 RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	Unid	vol
	Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras (12x8) recubiertas con antígeno positivo. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with positive antigen	2
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras (12x8) recubiertas con antígeno negativo. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with negative antigen	2	
Viales conteniendo suero Control Positivo, listo para su uso Vials containing Positive Control serum, ready to use	1 vial	4 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo, listo para su uso Vials containing Negative Control serum, ready to use	1 vial	4 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) listo para su uso Vials with conjugate ready to use (MAb peroxidase conjugated)	1 frasco	50 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE13-01) Bottles containing diluent (DE13-01)	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB), ready to use	1 frasco	65 ml
Frascos conteniendo solución de frenado.(Ácido Sulfúrico) Bottles containing stop solution.(Sulphuric acid)	1 frasco	65 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT
OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

<p>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)</p>	<p>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)</p>
---	---

I. FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al EAV (*Virus de la Arteritis equina*), y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero.

El método se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto que se describe a continuación:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno específico del EAV y sobre otra placa se fija un antígeno negativo. Sobre ambos antígenos se dispensan los sueros. Si el suero, contiene anticuerpos específicos del virus quedarán unidos a él. Tras un paso

de lavado para retirar los componentes del suero no unidos se añade un anticuerpo monoclonal (AcM) específico de inmunoglobulinas equinas conjugado con peroxidasa, que se unirá a aquellos anticuerpos que hayan quedado fijados al antígeno viral o al antígeno negativo. Esta unión se revela con un sustrato adecuado de la peroxidasa dando una reacción colorimétrica medible. Así la presencia de color indicará la presencia de anticuerpos frente al EAV o el antígeno negativo en el suero ensayado. La diferencia entre ambas señales determinará si los anticuerpos unidos son específicos de EAV.

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. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

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

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:

Los sueros problema se utilizarán a la dilución **1/100** (5µl de suero en 495 µl de diluyente es

suficiente para ensayar una muestra por duplicado tanto sobre el antígeno positivo como sobre el antígeno negativo).

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.

- **Controles (+) y (-) :**

Se presentan listos para su utilización en el kit. Añadir directamente 100 µl de los controles a los pocillos.

- **Conjugado:**

Se presenta listos para su utilización en el kit. Añadir directamente 100 µl del conjugado a los pocillos.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros:** Dispensar 100 µl/pocillo de las diluciones de las muestras preparadas según instrucciones anteriores, sobre el antígeno positivo y 100µl sobre el antígeno negativo. Añadir en último lugar los controles **Incubar 2 horas a 37°C.**
- ii **Atención, sellar perfectamente los pocillos con los cobertores adhesivos para evitar la evaporación de las muestra durante la incubación!!**
3. Lavar 3 veces según procedimiento anteriormente descrito.
4. **Adición del conjugado:** Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo, **Incubar 30 min a temperatura ambiente.**
5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. **Adición del sustrato:** Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. **Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.** (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo). Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar este proceso lo más posible.
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 450 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 **450 nm.**

En todos los casos (controles y muestras) se restará la absorbancia obtenida con el antígeno negativo de la obtenida con el antígeno positivo.

A. Validación del test:

El test se considerará válido cuando:

Control Positivo $\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} > 0.5$

Control Negativo $\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} < 0.1$

B. Interpretación de resultados

- **Muestras positivas y negativas**

Las muestras se considerarán positivas (presentan anticuerpos frente a EAV), cuando **Abs Ag POS – Abs Ag NEG > 0.15**

Las muestras se considerarán negativas (no presentan anticuerpos frente a EAV), cuando

Abs Ag POS – Abs Ag NEG < 0.1

- *Muestras comprometidas*

Las muestras que presenten valores entre 0.1 y 0.15 en la que podría denominarse "Zona Gris" se recomienda que se repitan. Si la muestra repetida se mantiene en la zona gris

recomendamos se ensaye una nueva muestra de una segunda extracción de sangre, tomada como mínimo, 15 días después de realizada la primera.

Todas las muestras positivas y comprometidas deberán confirmarse por seroneutralización.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). The technique is briefly described below:

We fix positive and negative antigens on different plates. When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind the viral antigen adsorbed on plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material from the sera sample, the presence of horse immunoglobulins can be detected

using a specific peroxidase conjugated. After the addition of the substrate a colorimetric reaction will appear that can be measured using an ELISA reader.

Therefore the difference between the OD obtained with the positive and the negative antigen will determine the presence or absence of specific antibodies against the virus in the horse serum.

The aim of this kit is to provide users with a reliable and fast diagnostic technique for this disease, which up until now has been made by virus neutralization.

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 reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
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. The stop solution is a strong acid and therefore must also be handled with care. In case of an accidental contact with skin, rinse gently with water.
10. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
11. The substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

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

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps can be done using an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well.

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 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.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be assayed at 1/100 dilution. (i.e. 5 µl of serum in 495 µl of diluent is enough to run a sample in duplicate)

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 concentrate solution and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C y +8°C.

- **Control sera (+) and (-):**

Controls are ready to use. Do not dilute.

- **Conjugate::**

Controls are ready to use. Do not dilute.

VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (20-25°C) (except conjugate).
2. Add 100 µl of the sera samples, diluted as previously described, to each of the appropriate wells in both the positive and negative plate. Then add 100 µl of the positive and negative control sera to both plates in their corresponding wells. **Seal tightly the plate** (to avoid evaporation) and **incubate for 2 h at 37°C**.
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of the conjugate to each well.

Seal the plate and **incubate for 30 min at room temperature**.
5. Wash 6 times following the procedure previously described.
6. Add 100 µl of the substrate solution. Keep the plate for **10 min at room temperature**. Start timing after filling the first well.
7. Add 100 µl of the stop solution, to each well following the same order in which the substrate was added.
8. Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

The OD obtained with the negative antigen must be subtracted from the OD obtained with the positive antigen (for samples and controls)

A. Validation criteria:

The test can be considered valid when :

Positive Control: OD POS Ag – OD NEG Ag > 0,5

Negative Control: OD POS Ag – OD NEG Ag < 0,1

B. Results Interpretation:

- **Positive and negative samples**

A sample should be considered positive for antibodies to EAV when

OD POS Ag – OD NEG Ag > 0,15

A sample should be considered negative for antibodies to EAV when

OD POS Ag – OD NEG Ag < 0,1

- **Doubtful samples**

Samples showing values between 0.1 and 0.15 ("Grey zone") should be considered doubtful and be retested. If the same result is obtained we recommend assaying a new extraction taken 15 days after the first one.

All positive and doubtful (grey zone) samples must be confirmed by seroneutralization.

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:

