

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



# INGEZIM RINONEUMONITIS

Prod Ref: 14.HVE.K1

Ensayo inmunoenzimático Indirecto para la detección de anticuerpos frente a Herpesvirus equino (I y IV) en suero de caballo.

Indirect Immunoenzymatic assay for detection of specific antibodies to Equine Herpesvirus (I & IV) in horse serum.

Última revisión / Last revision: 160216  
Nº registro en España/ Spanish Registration number: 10483-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. Vials containing Positive Control sera	1 vial	4ml	2	4 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo. Vials containing Negative Control sera	1 vial	4ml	2	4ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated (MAb peroxidase conjugated)	1 vial	350 µl	2	350 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-05). Bottles containing diluent (DE01-05).	1 frasco	100 ml	2	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (ABTS). Bottles containing substrate (ABTS).	1 frasco	30 ml	1	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stop solution	1 frasco	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 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

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de suero equino mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente al Herpesvirus Equino, mientras que la falta de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

## 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.

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:

Se utilizará a la dilución 1/100 (p. ej. 5 µl de muestra en 495µl de diluyente suministrado).

## VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Solución de lavado:**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrado 25x más 960 ml de agua destilada). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

- **Diluyente:**

Diluir una parte de diluyente 5x concentrado suministrado en el kit con 4 partes de agua destilada. (100 ml de concentrado más 400 ml de agua destilada).

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

Los controles se presentan a la dilución de uso.

- **Preparación del conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**

Realizar una dilución 1/100 en diluyente suministrado (p. ej. Para una placa, 110 µl de conjugado concentrado y hasta 11 ml de diluyente).

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

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Añadir 100 µl de cada muestra por pocillo diluida como se indica en el punto V. Es recomendable, pero no obligatorio, hacer duplicados de cada muestra. Añadir 100 µl/pocillo de los controles (+) y (-) por duplicado. Tapar la placa **e incubar a 1 hora a 37°C.**
3. Lavar cuatro veces la placa según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa **e incubar 30 min. a 25 °C.**
5. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato por pocillo. **Mantener la reacción 15 minutos a temperatura ambiente.** Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar lo más posible este proceso.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

---

La lectura se realiza a una longitud de onda de **405 nm**.

### A. Validación del test:

---

El kit se considerará válido cuando:

- La Abs 405 nm del Control (-) es menor de 0.3
- La Abs 405 nm del Control (+) es mayor de 1.0

### B. Cálculo del índice de positividad (M/P):

---

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

Para calcular el índice M/P, realizar la siguiente operación:

$$M/P = \frac{(\text{Abs}405 \text{ nm Muestra}) - (\text{Abs}405\text{nm C. Neg})}{(\text{Abs}405\text{nm C.Pos}) - (\text{Abs}405\text{nm C.Neg})}$$

### C. Interpretación de resultados (punto de corte)

---

- Se considera una muestra como positiva si su índice M/P es  $\geq 0,3$ .
- Se considera una muestra como negativa si su índice M/P es  $< 0,3$

## I. TECHNICAL BASIS

---

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). We make a brief description of the technique below:

We fix the antigen on a solid support (polystyrene plate). When a serum sample contains specific antibodies against the virus, they will bind the antigen adsorbed on plate. After washing to eliminate all non-

fixed material from the sera sample, we can detect the presence of horse immunoglobulins using a specific peroxidase conjugate. After the addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which could be measured by an ELISA reader.

In this way the presence of colour means the presence of antibodies against the virus in the horse sera, and the absence of colour the absence of specific antibodies.

## 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 sensible to light and contamination.
11. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water

## 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:

---

Serum samples must be diluted 1/100 in provided diluent (i.e, 5 µl of sample and 495 µl of diluent).

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled water. When ready, this solution remains stable between +2°C y +8°C.

- **Diluents:**

Dilute 1 volume of provided 5x concentrated diluent with 4 volumes of distilled or deionized water.

**Controls:**

Controls are ready to use.

- **Preparation of the conjugate:**

Prepare the dilution 1/100 in provided diluent (for one plate, 110 µl of concentrated conjugate up to 11 ml of diluent)

**ATTENTION:** For conjugate, prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

## VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of each sample per well of the plate (diluted as previously indicated on point V). We recommend duplicating each sample for confirmatory purposes (not mandatory).  
  
Add 100 µl of the positive and negative controls, to their respective wells (two wells/control). Seal the plate and **incubate for 60 min. at 37°C**.
3. Wash 4 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 min. at 25°C**.
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature**. We recommend using a multichannel pipette to make the process quickly.
7. Add 100 µl of stop solution to each well to stop the reaction. We recommend adding this reagent following the same order as it was added the substrate.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

### A. Validation criteria:

The test is considered valid when:

- OD value of the positive control is higher than 1.0
- OD value of the negative control is lower than 0.3

### B. Positivity index calculation:

If you run samples in duplicate, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values.

To obtain S/P of the samples:

$$S/P = \frac{OD\ 405\ nm\ Sample - OD\ 405nm\ C\ (-)}{OD\ 405nm\ C\ (+) - OD\ 405nm\ C\ (-)}$$

### C. Results Interpretation (Cut off):

When you are running duplicate samples, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values

- Samples with S/P ≥ 0.3 will be considered as positive.
- Samples with S/P < 0.3 will be considered as negative.

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](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)

Distributed in \_\_\_\_\_ by:



IT-73840  
IT-73780



ISO 14001:2015  
9191.INGE



ISO 9001:2015  
9175.ING2