



INgezim® AHSV COMPAC PLUS

Prod Ref: 14.AHS.K3

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.

Version Doc:30.05.2024

Nº de registro en España: 1390-RD

Registration number in Spain: 1390-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5	
Viales de Control Positivo, listo para usar	1	2,5mL	2	2,5mL
Viales de Control Negativo, listo para usar	1	2,5mL	2	2,5mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30mL	2	30mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	125mL	2	125mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	65mL	1	65mL
Frascos conteniendo Sustrato (ABTS), listo para usar	1	30mL	1	60mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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 50-250 mL.
Lector ELISA (filtro de 405 nm)

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.

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 y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. 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.
8. La solución de frenado conservada en refrigeración podría precipitar, en ese caso se puede calentar a 37°C hasta su completa disolución. La solución de frenado puede formar espumas. Evitar dispensar burbujas en la placa ya que podría afectar la lectura de los resultados.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

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:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de NaOH 0,1M, ya que las muestras problema podrían contener agentes infecciosos.
- Distribuir unos 300 µL de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el 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.

PREPARACIÓN 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.

PREPARACIÓN DE 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 listos para su uso y no necesitan preparación alguna. Añadir 100 µL/pocillo.

Preparación del conjugado:

El conjugado se presenta listo para su uso y no necesita preparación alguna.

Preparación de sustrato:

Listo para usar.

PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µL 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.**
3. Lavar 5 veces siguiendo las instrucciones descritas anteriormente.
4. Añadir 100 µL de conjugado a cada uno de los pocillos. **Tapar la placa e incubar 30 minutos a 37°C.**
5. Lavar 5 veces siguiendo las instrucciones descritas anteriormente.
6. Añadir 100 µL de sustrato en cada pocillo de la placa. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. **Tapar la placa e incubar 10 minutos a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C).**
7. Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo, siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
8. **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.
9. Leer en espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda en los siguientes 5 minutos tras la adición de la solución de frenado.

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).

VALIDACIÓN DEL TEST:

El test se considerará válido cuando:

- DO Control (-) > 1
- DO Control (+) < 0,2

INTERPRETACIÓN:

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

$$PB = \frac{\text{Abs Control neg.} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control neg.} - \text{Abs Control pos.}} \times 100$$

- Los sueros cuyo valor de PB sean > **50%** se consideran **positivos** a peste equina.
- Los sueros con valor de PB sean < **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.

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.

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials with Positive Control, ready to use	1	2,5mL	2	2,5mL
Vials with Negative Control, ready to use	1	2,5mL	2	2,5mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	125mL	2	125mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	65mL	1	65mL
Bottles with Substrate (ABTS), ready to use	1	30mL	1	60mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Distilled or deionized 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)

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.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used and never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution can precipitate at refrigeration, in this case, incubate at 37°C before use, to eliminate the precipitation. The stop solution may form foams. Avoid dispensing bubbles on the plate as this may affect the reading of the results.

STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C.

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 turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
- 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. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

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.

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 Controls (+) y (-):

Controls are ready to use and do not need any preparation. Dispense 100 µL of each one.

Preparation of conjugate:

Conjugate is ready to use and does not need any preparation.

Preparation of substrate:

Ready to use.

TEST PROCEDURE

1. All reagents must be brought to room temperature (**20°C to 25°C**) before use.
2. Dispense 100 µL of diluted samples into appropriate wells (dilution 1/5). We recommend running the samples in duplicate. Dispense 100 µL of positive control into two wells and 100 µL of negative control into two wells. **Seal the plate and incubate for 1 hour at 37°C.**
3. Wash 5 times as described before
4. Add 100 µL/well of conjugate. **Seal the plate and incubate for 30 minutes at 37°C.**
5. Wash 5 times as described before.
6. Dispense 100 µL/well of substrate using a multichannel pipette. **Seal the plate and incubate for 10 minutes at room temperature.**
7. Dispense 100 µL/well of stop solution. Take care to avoid dispensing of bubbles.
8. Read at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

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

VALIDATION OF CRITERIA:

- The OD of the Positive control < 0.2
- The OD of the Negative control > 1.0

INTERPRETATION:

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

$$PB = \frac{\text{Abs Neg. control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs Neg. control} - \text{Abs Pos. control}} \times 100$$

- Samples showing BP value > **50%** are considered as **positive** for antibodies to AHS virus.
- Samples showing BP value < **45%** are considered **negative** for antibodies to AHS virus.
- Samples with BP value between **45% and 50%** are considered **doubtful** and they must be retested. If the result is the same, another extraction must be made and tested 2 weeks later.

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.

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA
C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



Distribuido en

Distributed in

por

by