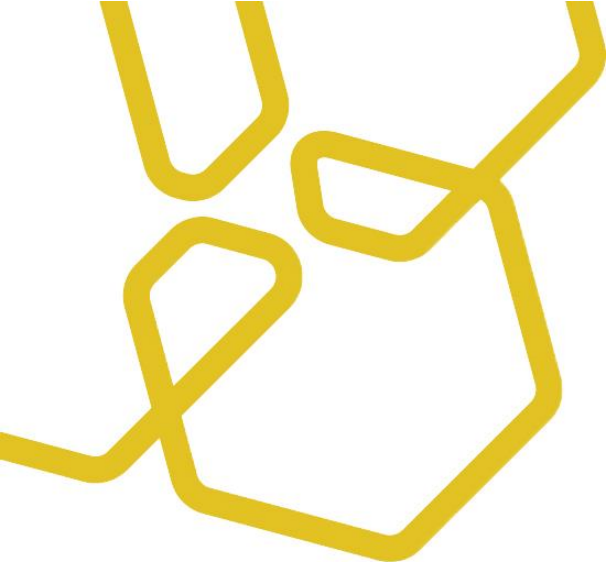




INgezim® EHDV Compac

Prod Ref: 12.EHD.K.3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Enfermedad hemorrágica epizootica en muestras de suero, plasma, sangre o sangre secada en papel de filtro de bovinos, ovinos, caprinos y cérvidos.

Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of specific antibodies to Epizootic hemorrhagic disease virus in serum, plasma, blood or blood dried onto filter paper samples from cattle, sheep, goat, or deer.

Version Doc:18.06.2025

Nº de registro en España: 12647-RD

Registration number in Spain:



COMPOSICIÓN DEL KIT

<i>REACTIVO</i>	<i>2 Placas</i>		<i>5 Placas</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5	
Viales de Control Positivo	1	1 mL	2	1 mL
Viales de Control Negativo	1	1 mL	2	1 mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa concentrado 100x	1	350 µL	2	350 µL
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01), listo para usar	1	60 mL	1	125mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30 mL	1	60 mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60 mL	1	60 mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Agua destilada o desionizada.
Micropipetas.
Puntas de micropipeta de un solo uso.
Dispositivos para lavado de placas.
Probetas.
Lector ELISA (filtro de 450 nm).

FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

Este kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de bloqueo (ELISA de bloqueo), que se describe brevemente a continuación:

Los pocillos de la placa llevan fijado el antígeno diana, la VP7 del virus de la Enfermedad hemorrágica epizootica (vEHE). Sobre ellos, se dispensan los sueros a testar y, después de un paso de lavado, se añade un anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína VP7 marcado con peroxidasa. En caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al vEHE, éstos se unirán a la proteína fijada en la placa imposibilitando la unión del anticuerpo monoclonal. Si el suero problema carece de dichos anticuerpos, será el anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa el que se una al antígeno fijado en la placa. Tras eliminar todo el material no unido a la placa mediante sucesivos pasos de lavado, la presencia de anticuerpo monoclonal unido se evidencia mediante la adición del sustrato cromogénico que adquiere, en presencia de peroxidasa, un color azul medible. De esta forma, la aparición de color en el pocillo indicará la ausencia de anticuerpos específicos frente al virus en la muestra ensayada y la ausencia de color indicará la presencia de anticuerpos en la muestra.

PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Dejar que los reactivos alcancen la 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 es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.
- 9.

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 infectivos.
- 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 boca abajo la placa sobre un papel de filtro absorbente para eliminar toda la solución de lavado.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Sangre, plasma o suero:

Las muestras deben ser sueros, plasmas o sangres tomados de vacas, ciervos, ovejas o cabras (no usar muestras muy hemolizadas o contaminadas, ya que pueden afectar al resultado del ensayo). Para su uso en el kit, las muestras deberán diluirse 1/2 en el diluyente (DE01-01) proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50 µL de diluyente y 50 µL de muestra.

Sangre seca en papel de filtro:

Añadir 2-3 gotas de sangre sobre un papel de filtro del tipo TFN specimen collection card (Ref. 8.460.0004.A-N, Ahlstrom Munksjö) y dejar secar durante toda la noche a temperatura ambiente (20°C - 25°C). Las muestras tomadas mediante este protocolo son estables a 4 °C durante mayores periodos de tiempo que las muestras de sangre frescas. Añadir 250 µL/pocillo de diluyente DE01-01 sobre una placa de microtitulación de baja o media capacidad de unión. Tomar dos trozos del papel de filtro empleando un sacabocados y añadirlos dentro del mismo pocillo para que se humedezcan con el diluyente. Incubar durante toda la noche (16-24 h) a 37°C ± 1°C. Añadir 100 µL/pocillo de la muestra extraída para realizar el ensayo. NO DILUIR. La utilización de muestras de sangre seca en papel de filtro puede mostrar una sensibilidad ligeramente inferior al uso de las otras matrices, especialmente en muestras débilmente positivas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (p.ej.: 40 mL de concentrado + 960 mL de H₂O_d). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C hasta la fecha de caducidad descrita en la etiqueta del frasco de solución concentrada.

Sueros Control (+) y (-):

Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir, para su ensayo deberá realizarse la dilución 1/2 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 µL de diluyente y 50 µL de suero.

Conjugado. A realizar inmediatamente antes de su utilización:

Realizar una dilución 1/100 en el diluyente suministrado en el kit (DE01-01):

- Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 10 µL de conjugado concentrado 100x en el diluyente (DE01-01) hasta un volumen final de 1 mL.
- Para una placa completa recomendamos diluir 110 µL de conjugado concentrado 100x en el diluyente (DE01-01) hasta un volumen final de 11 mL.

Agitar bien antes de su uso.

Preparar únicamente el volumen estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.

PROCEDIMIENTO

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (20°C - 25°C).
2. En caso de realizar la dilución en el mismo pocillo, añadir en primer lugar 50 µL de diluyente y a continuación 50 µL de las muestras y controles. De este modo obtendremos una dilución de los sueros 1/2. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la mezcla, teniendo precaución de que no se produzca trasvase de unos pocillos a otros.
3. Se recomienda ensayar los controles por duplicado. Sellar la placa e incubar 1 h ± 5 min a 25 ± 1°C.
4. Lavar 3 veces según el procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir en cada pocillo 100 µL del conjugado preparado como se describe en el punto anterior. Sellar la placa e incubar 30 ± 5 min a 25 ± 1°C.
6. Lavar 3 veces según el procedimiento descrito anteriormente.
7. Añadir 100 µL de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción durante 10 ± 1 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
8. Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
9. Leer la Absorbancia a 450 nm (Abs-450) de cada pocillo en un lector de ELISA en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL ENSAYO:

Para que el ensayo se considere válido, ha de cumplirse que el valor de Abs-450 media de los pocillos de control negativo sea al menos 5 veces superior al valor de Abs450 media de los pocillos del suero control positivo. Además, la Abs450 del control negativo debe ser superior a 1.

- 1) $\frac{Abs_{Control\ Negativo}}{Abs_{Control\ Positivo}} \geq 5$
- 2) $Abs_{Control\ Negativo} \geq 1$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Si se están analizando las muestras por duplicado, se tomarán como valor de Abs450 la media de los valores obtenidos en ambos pocillos.

Para interpretar el resultado de los ensayos, calcular el siguiente porcentaje:

$$\% \text{ Competición} = \left(\frac{Abs_{Control\ Negativo} - Abs_{Muestra}}{Abs_{Control\ Negativo} - Abs_{Control\ Positivo}} \right) \times 100$$

**Donde Abs hace referencia a la Absorbancia a 450 nm de cada muestra.*

Para muestras de ciervo:

- Se considerarán **positivas** aquellas muestras con un % competición mayor o igual al 40 %.
- Se considerarán **negativas** aquellas muestras con un % competición menor al 40 %.

Para muestras de vaca, cabra u oveja:

- Se considerarán **positivas** aquellas muestras con un % competición mayor o igual al 60 %.
- Se considerarán **negativas** aquellas muestras con un % competición menor al 60 %.

KIT COMPOSITION

REAGENT	2 Plates		5 Plates	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials Positive Control	1	1 mL	2	1 mL
Vials Negative Control	1	1 mL	2	1 mL
Vials with Peroxidasa Conjugate 100x concentrated	1	350 µL	2	350 µL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	60 mL	1	125mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30 mL	1	60 mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60 mL	1	60 mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

- Distilled or deionized water.
- Micropipettes.
- Disposable micropipette tips.
- Plate washing device.
- Test tubes.
- ELISA Reader (450 nm filter).

TECHNICAL BASIS

This kit is based on the blocking enzyme-linked immunosorbent assay (Blocking ELISA) technique, which is briefly described below:

The wells of the plate are coated with the target antigen, VP7 of the Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV). The serum to be tested is added into the wells and, after a washing step, a peroxidase-labeled monoclonal antibody specific for the VP7 protein is added to the wells. If the test serum contains antibodies to EHDV, these will bind to the protein immobilized on the plate, preventing binding of the monoclonal antibody. If the test serum does not contain such antibodies, the peroxidase-labeled monoclonal antibody will bind to the antigen immobilized on the plate. After removal of any unbound material from the plate by sequential washing steps, the presence of bound monoclonal antibody is detected by the addition of the chromogenic substrate, which turns into a measurable blue color in the presence of peroxidase. The appearance of color in the well indicates the absence of virus-specific antibodies in the tested sample, while the absence of color indicates the presence of antibodies in the sample.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions for 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. Do not eat, drink, or smoke while specimens or kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each sample to be tested.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used from the bottle and to never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
- 9.

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 pipette suitable for dispensing 300 µL in each well. After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions:

- Throw out the content of the plate by tightly overturning the plate to avoid the possible mixture of different wells content. 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 in each well.
- Softly mix the plate, avoiding the exchange of liquid between wells.
- Turn over the plate abruptly to empty the wells.
- Repeat the process as many times as 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 keep the plate dry.
- After the last washing step, shake the plate upside down on an absorbent filter paper to eliminate all washing buffer.

PREPARATION OF SAMPLES

Serum, blood, or plasma samples:

Serum, blood, or plasma samples collected from cattle, goat, sheep, or deer can be used in the kit (do not use highly hemolyzed or contaminated samples, they can affect assay's result). Samples must be assayed at a 1/2 dilution in the supplied diluent (DE01-01). This dilution could be done directly in the plate by adding 50 µL of diluent and 50 µL of sample into each well.

Dried blood on filter paper:

Add 2-3 drops of blood onto a filter paper, for example TFN specimen collection card (Ref. 8.460.0004.A-N, Ahlstrom Munksjö) and allow to dry overnight at room temperature (20°C - 25°C). Samples collected by this protocol are stable at 4°C for longer periods of time than fresh blood samples.

Add 250 µL/well of DE01-01 diluent to a low or medium binding capacity microtiter plate. Take two pieces of the filter paper using a punch and add them into the same well to be wetted with the diluent. Incubate overnight (16-24 h) at 37°C ± 1°C.

Add 100 µL per well of the extracted sample to perform the assay. DO NOT DILUTE.

The use of dried blood samples on filter paper may show slightly lower sensitivity than the use of the other matrices, especially in weakly positive samples.

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 (i.e., 40 mL of concentrate plus 960 mL of dH₂O). When ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C until the expiration date described on the label of the concentrated solution.

Control sera:

The control sera must be treated as test samples, diluted 1/2 in diluent prior to be used. This dilution can be done directly in the plate by adding 50 µL of diluent plus 50 µL of control serum.

Conjugate. To be prepared just prior to use:

Prepare a 1/100 dilution in the diluent included in the kit (DE01-01):

- For one strip, 8 wells, it is recommended to dilute 10 µL of the 100x-concentrated conjugate in diluent (DE01-01) to a final volume of 1 mL.
- For a complete plate, it is recommended to dilute 110 µL of the 100x-concentrated conjugate in diluent (DE01-01) to a final volume of 11 mL.

Shake gently before using.

It is recommended to only prepare the needed volume per each assay, since the leftover reagent must be discarded.

TEST PROCEDURE

1. Before performing the assay, let all kit components reach room temperature (20°C to 25°C).
2. If dilution is directly prepared in the plate, add first 50 µL of the supplied diluent to each well. Then, add 50 µL of control sera and of the samples to be tested. Softly shake the plate for an appropriate homogenization of the samples, careful to avoid liquid transfer between wells. It is recommended to include control sera in duplicate for each assay. Seal the plate and incubate for 1 h ± 5 min at 25 ± 1°C.
3. Empty the wells into a container with NaOH 0.1M solution and wash 3 times as previously described.
4. Add 100 µL of specific conjugate to each well. Seal the plate and incubate for 30 ± 5 min at 25 ± 1°C.
5. Wash 3 times as previously described.
6. Add 100 µL of substrate to each well. It is recommended to use multichannel pipettes for increased speed and homogeneity. Incubate the plate for 10 ± 1 min at room temperature, (20 - 25°C).
7. Add 100 µL of stop solution to each well following the same order used for substrate dispensation.
8. Read the Absorbance at 450 nm (Abs450) of each well using an ELISA reader within 5 min after the addition of the stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

VALIDATION OF THE TEST:

The test results should be considered valid only if the Abs450 of the Negative Control is, at least, 5 times higher than the Abs450 of the Positive Control, and if the Abs450 of the negative is higher to 1.

$$1) \frac{Abs_{Negative\ control}}{Abs_{positive\ control}} \geq 5$$

$$2) Abs_{Negative\ control} \geq 1$$

RESULTS INTERPRETATION:

When samples are tested in duplicate, Abs450 of the sample should be calculated as the arithmetic mean of values in both wells.

To interpretate assay's results, calculate the following percentage:

$$Competition \% = \left(\frac{Abs_{Negative\ Control} - Abs_{Sample}}{Abs_{Negative\ Control} - Abs_{Positive\ Control}} \right) \times 100$$

*Where Abs means Absorbance at 450 nm.

For deer:

- Samples with a S/N higher or equal to 40 % would be considered **positive**.
- Samples with a S/N lower than 40 % would be considered **negative**.
-

For cattle, goat, or sheep:

- Samples with a S/N higher or equal to 60 % would be considered **positive**.
- Samples with a S/N lower than 60 % would be considered **negative**.

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