



INGEZIM BTV COMPAC 2.0

Prod Ref: 12.BTV.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente al virus de la Lengua Azul en muestras de suero ensayadas individualmente.

Blocking enzymatic immunoassay for detection of antibodies specific for Blue Tongue virus in sera individually assayed.

Última revisión / Last review: 30-05-13
Registrado por el MAPYA nº 1125 RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas		5 placas		10 Placas	
	2 plates		5 plates		10 plates box	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos 96 Well microtitration plates	2	-	5	-	10	-
Viales de suero Control Positivo para BTV Vials of Positive Control Serum for BTV	1	600 µl	2	600 µl	4	600 µl
Viales de suero Control Negativo para BTV Vials of Negative Control serum for BTV	1	600 µl	2	600 µl	4	600 µl
Viales de Conjugado LISTO PARA SU USO (AcM anti BTV-HRPO) Vials with Conjugate READY TO USE (Mab anti BTV-HRPO)	1	30 ml	2	30 ml	2	60 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml	2	125 ml
Frascos de Diluyente (DE01-01) a la dilución de uso Bottles with serum diluent (DE01-01) ready to use	1	125 ml	1	125 ml	2	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml	1	125 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 ml	1	125 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

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al BTV, en ganado bovino, ovino y caprino y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero, o plasma de animales infectados. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de BTV. Cuando se añaden las muestras en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al

antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa. (Anticuerpo monoclonal específico para el virus). En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al bote el sustrato sobrante.

III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada. **Una vez abiertos**, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

IV. 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:

- Σ Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Σ Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Σ Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos
- Σ Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Σ Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Σ Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Σ Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución de lavado :**

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado mas 960 ml de agua).

- **Controles de Sueros:**

Se tratan como las muestras, añadiendo 50µl / pocillo sobre 50µl de diluyente.

¡ATENCIÓN! Una vez abiertos, los sueros controles son estables durante 1 mes conservados entre +2°C y +8°C. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20°C en alícuotas.

- **Conjugado:**

El conjugado se presenta listo para su uso y no es necesaria preparación alguna. Debe ensayarse añadiendo 100µl por pocillo.

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar una dilución ½ en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 50 µl de diluyente y luego 50 µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras:**
 - Añadir 50 µl de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar.
 - Añadir otros 50 µl de suero control positivo a dos pocillos y 50 µl de suero control negativo a otros dos pocillos. Rellenar el resto de los pocillos con 50 µl de los sueros problema a ensayar.

Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable valorar las muestras por duplicado
3. Tapar la placa e incubar durante 1 noche (18-24 horas) a temperatura ambiente (18-25°C) o alternativamente 2,5 horas a 37°C
3. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado, a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 30 min. a 37°C.
5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. 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).
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. **ATENCIÓN:** 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 450nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

1. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Control Positivo/Control Negativo < 0.25

2. CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

Punto de Corte (-) = 0.65 x Control Negativo
Punto de Corte (+) = 0.6 x Control negativo

3. CÁLCULO DE % DE BLOQUEO

$$\% \text{ BLOQUEO} = 100 - \frac{\text{DO muestra} \times 100}{\text{DO C. negativo}}$$

4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BTv), cuando su DO a 450 nm sea igual o inferior al cut off positivo (60 % del control negativo).

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BTv), cuando su DO a 450 nm sea igual o superior al cut off negativo (65% del control negativo).

Las muestras que presenten porcentajes de unión entre ambos valores se considerarán **DUDOSAS** y en estos casos se recomienda testar de nuevo al animal transcurridas 2 semanas.

I. TECHNICAL BASIS

The kit have been designed to detect antibodies specifics for BTV in sheep, goats and cattle being able to detect a very low titers of antibodies in sera, and plasma samples of infected animals.

The INGEZIM BTV kit is based on the blocking immunoenzymatic assay described below:

The solid phase is plates coated with VP7 protein of BTV. After adding the sample to the well, if it contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the sample does not contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

If we add a specific monoclonal antibody against the viral antigen coated to the plate (conjugated with peroxidase), it will compete with the antibodies of the sample. If the samples contain specific antibodies, they will not permit the binding of the labelled MAb to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the MAb will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled MAb by adding the substrate (TMB) that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

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 reagents of the Kit.
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. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
11. Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°C. **Once opened**, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°C.

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 REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water (i.e. 40 ml of concentrate and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable between +2°C and +8°C.
- **Positive and Negative serum controls:**
Controls must be tested as sample serum adding 50µl / well over 50. µl of diluent.

!ATTENTION! Once opened, they are stable at least four 1 month between +2°C y +8°C. For long term storage, we recommend making aliquots and store them at -20°C.

- **Preparation of the conjugate :**
Conjugate is ready to use and must be used adding 100µl / well.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

They must be assayed diluted 1/2 in diluent. This dilution could be made directly on the assay plate by adding 50 µl of diluent and 50 µl of sample to each well.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. **Addition of samples:**
 - Add 50 µl of diluent to each well. Add 50 µl of each sample to be assayed.
 - For controls add 50 µl as it is indicated in point V.

We recommend to assay the samples by duplicate
3. Seal the plate and incubate over night (18-24 hours) at room temperature or alternatively 2.5 hours at 37°C.
4. Wash 6 times following the described procedure.
5. Add 100 µl of conjugate ready to use to each well. Seal the plate and incubate for 30 min. at 37°C.
6. Wash 6 times following the described procedure.
7. Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for 10 min at room temperature.
8. Add 100 µl of stop solution to each well.
9. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

In case that the samples had been run in duplicate, it has to be considered the mean of both OD values. In the same way, the mean of the values obtained in the two well of positive and the two well of negative control has to be made.

3. BLOCKING % CALCULATION

$$\text{Blocking \% of sample} = 100 - \frac{\text{Sample OD} \times 100}{\text{Negative control OD}}$$

1. VALIDATION OF THE RESULTS

Positive Control / Negative Control < 0.25

2. CUT OFF CALCULATION

Cut Off (-) = 0.65 x Negative Control

Cut Off (+) = 0.6 x Negative Control

4. RESULTS INTERPRETATION

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific for BTv), when de OD at 450nm was equal or lower than the positive cut off (60 % of negative control).

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for BTv in the sample) when the OD value at 450nm was equal or higher than the negative cut off (65% of negative control).

Samples with percentages of binding between both cut off have to be considered **DOUBTFUL**. In these cases a new sample of the animal is recommended to be analysed in two weeks.

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:

