



INGEZIM BLV CONFIRMATION

Prod Ref: 12.BLV.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección de anticuerpos frente al virus de la leucosis enzoótica bovina en suero bovino

Indirect enzymatic immunoassay for detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus (BLV) in bovine serum

Última revisión / Last revision: 01-14

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 3471 RD

INGEZIM BLV CONFIRMATION
12.BLV.K1COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT		
	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras (12x8) tapizadas con antígeno positivo. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with viral antigen	5	-
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras (12x8) y marcadas en rojo tapizadas con antígeno negativo. 96 well microtitration plates divided in Red-coloured strips (12 x 8) coated with negative antigen	5	
Viales conteniendo suero Control Positivo, listo para su uso Vials containing Positive Control serum, ready to use	1	8 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo, listo para su uso Vials containing Negative Control serum, ready to use	1	8 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM anti-IgG bovina marcado con peroxidasa) concentrado 100x Vials containing conjugate 100x concentrated (MAb anti-bovine IgG peroxidase conjugated)	1	1.3 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	250 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE14-01) Bottles containing diluent (DE14-01)	2	250 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1	120 ml
Frascos conteniendo solución de frenado.(Ácido Sulfúrico) Bottles containing stop solution.(Sulphuric acid)	1	120 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 BLV (*Virus de la Leucosis Bovina*), 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 BLV y sobre otra placa se fija un antígeno control. 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 bovinas 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 BLV o el antígeno negativo en el suero ensayado. La diferencia entre ambas señales determinará si los anticuerpos unidos son específicos de BLV.

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

INGEZIM BLV CONFIRMATION

12.BLV.K1

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 pueden analizarse de forma individual y en pools de hasta 10 sueros. Los sueros problema se utilizarán a la dilución **1/50** realizada en una placa vacía (5µl de suero en 245 µl de diluyente DE14-01 es suficiente para ensayar una muestra sobre el antígeno positivo y sobre el antígeno negativo). El kit está diseñado para 460 muestras una vez utilizados 4 pocillos para los controles.

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 durante un tiempo máximo de 3 meses siempre que se mantengan en condiciones adecuadas.

• **Controles (+) y (-) :**

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

• **Conjugado:**

Diluir 1/100 en el diluyente suministrado (110µl de concentrado en 11 ml de diluyente es cantidad suficiente para una placa) .

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. (se recomienda hacer duplicados de los controles positivo y negativo, utilizando 2 pocillos para cada uno teniendo la precaución de no poner los controles en las filas exteriores para evitar el efecto borde observado en algunas estufas). Sellar la placa con el adhesivo e **Incubar 30 min a 37°C.**
3. Lavar 3 veces según procedimiento anteriormente descrito.
4. **Adición del conjugado:** Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo, **Incubar 30 min a 37°C.**
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 $\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} > 0.3$

Control Negativo $\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} < 0.2$

B. Interpretación de resultados

- Muestras positivas y negativas**

Las muestras se considerarán positivas (presentan anticuerpos frente a BLV), cuando

$$\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} > 0.3$$

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

$$\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG} < 0.25$$

- Muestras comprometidas**

Las muestras que presenten valores entre 0.30 y 0.25 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.

En nuestra página web, existe a disposición de los clientes un fichero Excel para la correcta interpretación de los resultados.

INGEZIM BLV CONFIRMATION

12.BLV.K1

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 to the viral antigen adsorbed on the plate. After a washing step to eliminate all non-fixed material from the sera sample, the presence of bovine immunoglobulins can be

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

This way 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 bovine serum.

The aim of this kit is to provide the users with a reliable and rapid confirmatory diagnostic technique for this disease.

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's reagents.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different batches.
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. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
10. Substrate must be handled with care, as it is very sensible to light and contamination.
11. Stop solution is a strong acid solution and therefore must be handled with care. 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

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING PROCEDURE

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:

Sera can be assayed individually or in pools up to 10 sera. Dilute the samples at **1/50** in a dummy plate (i.e. 5 µl of serum in 245 µl of diluent DE14-01 is enough to run a sample in one well with viral antigen and in another well with control antigen). The kit has been designed for 460 samples once 4 wells have been used for controls.

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 concentrated solution and 960 ml of water). Once this solution ready, it remains stable between +2°C and +8°C for 3 months maximum as long as adequate conditions will be maintained.

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

Controls are ready to use. Do not dilute. (plate).

- **Conjugate:**

Dilute 1/100 in the conjugate diluent provided in the kit (110µl of concentrated conjugate in 11 ml of diluent is enough for one

VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C).
2. Add 100 µl of the serum samples diluted as previously described onto the positive and negative antigens. **Seal tightly the plate and incubate for 30 min at 37°C.** We recommend running control sera in duplicate using 2 wells for each one. In order to avoid border effect detected when some kind of incubators are used, it is recommendable not use the external files to add the controls).
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µL of the conjugate at the indicated dilution, to each well.

Seal the plate and **incubate for 30 min at 37°C.**

5. Wash 6 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of the substrate solution. Keep the plate for **10 min at room temperature.** Start timing after adding it to the first well.
7. Add 100 µl of the stop solution, to each well in the same order in which the substrate was added.
8. Read the absorbance of each well with a spectrophotometer at 450 nm within the following 5 min after the addition of the 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 (sample and controls)

A. Validation criteria:

The test can be considered valid when:

Positive Control: OD POS Ag – OD NEG Ag > 0,3

Negative Control: OD POS Ag – OD NEG Ag < 0,2

B. Results Interpretation:

- **Positive and negative samples**

Samples should be considered positive for antibodies to BLV when:

OD POS Ag – OD NEG Ag > 0,3

Samples should be considered negative for antibodies to BLV when:

OD POS Ag – OD NEG Ag < 0,25

- **Doubtful samples**

Samples showing values between 0.30 and 0.25 ("Grey zone") should be considered doubtful and be retested. If the result remains the same we recommend to test a new extraction obtained 15 days after the first one.

For the interpretation of results a Microsoft excel file is available in our web.

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
Av.de la Institución Libre de Enseñanza, 39 8^a
planta
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: