



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.

Version Doc:29.05.2024

Nº de registro en España: 1125-RD

Registration number in Spain: 1125-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas		10 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5		10	
Viales de Control Positivo	1	600µL	2	600µL	4	600µL
Viales de Control Negativo	1	600µL	2	600µL	4	600µL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30mL	2	30mL	2	60mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL	2	125mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	125mL	1	125mL	2	125mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL	1	125mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL	1	125mL

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 450 nm)

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.

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 es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.
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 a -20°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 la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Realizar una dilución 1/2 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.

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 más 960 mL de agua).

Controles de Sueros:

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

Conjugado:

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

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 (entre +20°C y +25°C) o alternativamente 2,5 horas a 37°C**
4. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µL de conjugado, a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 30 min a 37°C**.
6. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
7. 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).
8. 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.
9. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

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.

VALIDACIÓN DE RESULTADOS

- Control Positivo/Control Negativo < 0,25

CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

- Punto de Corte (-) = 0,65 x Control Negativo
- Punto de Corte (+) = 0,6 x Control negativo

CÁLCULO DE % DE BLOQUEO

$$\% \text{ Bloqueo} = 100 - \frac{\text{DO Muestra} \times 100}{\text{DO Control negativo}}$$

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 considerarán **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.

KIT COMPOSITION

REAGENT	2 Plates		5 Plates		10 Plates	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5		10	
Vials with Positive Control	1	600µL	2	600µL	4	600µL
Vials with Negative Control	1	600µL	2	600µL	4	600µL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL	2	60mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL	2	125mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	125mL	1	125mL	2	125mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL	1	125mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL	1	125mL

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 (450 nm filter)

TECHNICAL BASIS

The kit has been designed to detect antibodies specific 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.

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 is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

STORAGE OF COMPONENTS

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

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 in aliquots at -20°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

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.

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 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 50 µL/well over 50 µL of diluent.

Preparation of the conjugate:

Conjugate is ready to use and must be used adding 100 µL/well.

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 overnight (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.

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.

VALIDATION OF THE RESULTS:

- Positive Control / Negative Control < 0.25

CUT OFF CALCULATION:

- Cut Off (-) = 0.65 x Negative Control
- Cut Off (+) = 0.6 x Negative Control

BLOCKING % CALCULATION:

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

RESULTS INTERPRETATION

- Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific for BTV), when the OD at 450 nm 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 those cases, a new sample of the animal is recommended to be analyzed in two weeks.

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