



INGEZIM BLV COMPAC 2.0

Prod Ref: 12.BLV.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la leucosis enzootica bovina en suero y leche.

Blocking immunoenzymatic assay for the specific detection of antibodies to bovine leukaemia virus in bovine serum or milk

Ultima revision / Last revision: 21-04-15

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 0808-RD

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)		10 placas (10x8x12 pocillos) 10 plates box (10x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos ó de 96 pocillos 96 Well microtitration plates divided in 12 strips of 8 wells each	2	-	5	-	10	-
Viales de suero Control Positivo Vials of Positive Control Serum	1	1,5 ml	2	1,5 ml	2	1,5 ml
Viales de suero Control Negativo Vials of Negative Control serum	1	1,5 ml	2	1,5 ml	2	1,5 ml
Viales de Conjugado (100x concentrado) Vials with Conjugate (100 x concentrated)	1	700 µl	1	700 µl	2	700 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125ml	2	125 ml
Frascos de Diluyente (DE04-01) a la dilución de uso Bottles with diluent (DE04-01) ready to use	1	125 ml	1	125 ml	2	125 ml
Frascos de 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 TECNICO DEL KIT

Es un inmunoensayo enzimático de competición basado en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del virus de la Leucosis Enzootica Bovina (LEB). El test permite la detección de anticuerpos específicos del virus en sueros bovinos valorados tanto en forma individual como en mezclas de 10 sueros.

La fase sólida está constituida por placas de microtitulación sensibilizadas con gp51 capturada mediante anticuerpos monoclonales específicos. En el primer paso, se añade la muestra de suero.

Si esta contiene anticuerpos específicos de LEB estos se unirán al antígeno capturado en los pocillos. Finalmente, se añade otro monoclonal específico de LEB conjugado con peroxidasa cuya unión al antígeno quedará bloqueada por los anticuerpos presentes en el suero problema. Tras lavar y añadir el sustrato cromógeno (TMB) no se observará desarrollo de color en el pocillo.

Lo contrario ocurrirá en el caso de muestras de suero negativas a LEB. No existirá bloqueo del monoclonal conjugado y por tanto se desarrollará color en el pocillo.

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. La solución de frenado es un ácido, manejar con Precaución.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. El sustrato es un reactivo altamente sensible a la luz y a las contaminaciones. Es recomendable retirar por decantación (o mediante pipeta estéril) el volumen necesario, y jamás devolver al bote el volumen sobrante.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C).

IV. INFORMACION 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.
- 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 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.

• **Sueros controles:**

Los controles serán tratados como las muestras, poniendo 50µl por pocillo.

Preparación de conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.

Realizar una dilución 1/100 en diluyente (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente es cantidad necesaria y suficiente para 1 placa). Homogeneizar bien la solución antes de su utilización

Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

VI. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

• **Uso de sueros:**

Las muestras pueden ser analizadas individualmente o en mezclas a partes iguales de hasta 10 animales.

• **Uso de leche:**

Las muestras solo pueden ser analizadas individualmente. Es conveniente desnatar la muestra.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Añadir 50 µl de diluyente DE04-01 a cada pocillo. Añadir 50 µl de los controles positivo y negativo (se recomienda hacer duplicados de los controles positivo y negativo, utilizando 2 pocillos para cada uno y teniendo la precaución de no poner los controles en las filas exteriores para evitar el efecto borde observado en algunas estufas) y 50 µl de cada muestra a testar en cada uno de los pocillos de la placa, para conseguir una dilución 1/2 de las muestras. Es recomendable realizar el ensayo por duplicado. Agitar suavemente para la correcta mezcla de reactivos e incubar **1 hora a 37°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado.
4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo, preparado según instrucciones anteriores. Incubar **30 minutos a 37°C**.
5. Lavar 4 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Incubar **10 minutos a temperatura ambiente (20°C-25°C)**, en oscuridad.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.
8. Leer a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

En caso de duplicados, se tomará como valor de absorbancia de cada suero, la media de los valores de absorbancia obtenidos en los dos pocillos.

En este último caso se recomienda volver a valorar al animal a las 3 semanas.

A.- VALIDACION DEL TEST:

Para que el test se considere válido:

- ❖ El valor de absorbancia del control negativo ha de ser al menos 5 veces superior al valor de absorbancia del suero control positivo:

$$5 < \frac{\text{Absb (Control -)}}{\text{Absb (Control +)}}$$

* EL valor de absorbancia del suero control negativo ha de ser mayor de 1.

B.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

1. **Cálculo de CUT OFF (Puntos de corte):**

$$\begin{aligned}\text{CUT OFF (-)} &= \text{CN} - [(\text{CN} - \text{CP}) \times 0.4] \\ \text{CUT OFF (+)} &= \text{CN} - [(\text{CN} - \text{CP}) \times 0.5]\end{aligned}$$

Siendo : CN = Valor Absb del suero control (-)
CP = Valor Absb del suero control (+)

2. **Resultado del ensayo :**

Siendo M el valor de absorbancia de cada muestra:

- Si $M \geq \text{CUT OFF (-)}$ » muestra negativa
- Si $M \leq \text{CUT OFF (+)}$ » muestra positiva
- Si $\text{CUT OFF (-)} > M > \text{CUT OFF (+)}$ » muestra dudosa

EJEMPLO :

$$\begin{aligned}\text{Abs (control +)} &= 0.154 \\ \text{Abs (control -)} &= \mathbf{1.750} \\ \text{Abs (muestra 1)} &= \mathbf{0.170} \\ \text{Abs (muestra 2)} &= 1.684\end{aligned}$$

1. **Validación del test:**

$$\frac{\text{Abs (control -)}}{\text{Abs (control +)}} = \frac{1.750}{0.154} = \mathbf{11.3 > 5}$$

2. **Cálculos de Puntos de Corte:**

$$\text{CUT OFF (-)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.4] = 1.111$$

$$\text{CUT OFF (+)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.5] = 0.952$$

3. **Resultado de las muestras:**

Absb (muestra 1) = 0.170 < Cut off (+) Muestra 1:
Positiva
Absb (muestra 2) = 1.684 > Cut off (-) Muestra 2:
Negativa

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

I. TECHNICAL BASIS

This Kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (Blocking Elisa) based on the use of two monoclonal antibodies against the viral gp51. This test allows the detection of antibodies against the BLV in bovine serum or milks (individual or pooled). We make a brief description of the technique below:

The solid phase are plates coated with BLV gp51, bound to the plate through two specific monoclonal antibodies against the gp51 virus protein. 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 serum. If the serum samples contains 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. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
10. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handled 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.

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 deionized water(40 ml of concentrate 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.

- **Positive and Negative controls:**

Controls should be handled like samples, adding 50 µl/well.

- **Preparation of the conjugate (to make immediately before use):**

Dilute the needed quantity of conjugate

provided in the Kit 1/100 with diluent::

- ⇒ The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of Conjugate in 11 ml of diluent.
- ⇒ The necessary and sufficient quantity of Conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate in 1 ml of diluent.

Shake very well the solution before use.

Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

- **Use of serum:**

Samples can be tested individually or pooled (up to 10 serum samples).

- **Use of milk:**

Samples can be tested only individually. It is recommended to skim the milk samples before testing.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 50 µl of diluent DE04-01 to each well of the plate to be used. Add 50 µl of Positive control, Negative control and samples to the wells of the plate. In this way you are assaying the samples at a 1/2 dilution. Shake the plate carefully for the better homogenization of the dilution. 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). **Incubate the plate 1-hour at 37°C.**
3. Wash 3 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate (prepared following previous instructions) to each well. **Incubate the plate for 30 minutes at +37°C.**
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**, in a dark place.
7. Add 100 µl of stop solution to each well following the same order in which the substrate was added.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

- * If the OD value of the Negative Control Serum is more than 5 times the OD value of the Positive control Serum:

A. Validation of the Test:

The test could be considered valid:

$$\frac{\text{OD (Negative Control Serum)}}{\text{OD (Positive Control Serum)}} > 5$$

- * The OD of the Negative Control Serum must be > than 1.

B. Interpretation of the Results:

1. Cut Off calculation:

$$\sum \text{Negative Cut Off} = \text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0.4]$$

$$\sum \text{Positive Cut Off} = \text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0.5]$$

Where: NC = Mean of OD values of the Negative control serum.
PC = Mean of OD values of Positive Control Serum.

2. Results Interpretation:

When you are running duplicate samples, OD values will be calculate for each sample as the arithmetic mean of both values.

⇒ All samples with OD higher than or equal to negative CUT OFF value must be considered as Negatives.

⇒ All samples with OD values lower than or equal to Positive CUT OFF values will be considered as Positives

Samples with OD values between both cut-offs must be considered as doubtful. For these samples a new assay is recommended after 3 weeks.

EXAMPLE:

Means of OD

* Positive Control (PC)	0.154
* Negative Control (NC)	1.750
* Sample 1	0.170
* Sample 2	1.684

1. Test Validation:

$$\text{NC/PC} = 11.3 > 5$$

$$\text{NC} = 1.750 > 1$$

2. Cut off calculation:

$$\text{CUT OFF (-)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.4] = 1.111$$

$$\text{CUT OFF (+)} = 1.750 - [(1.750 - 0.154) \times 0.5] = 0.952$$

3. Results Interpretation:

Sample 1 » Positive to BLV antibodies
Sample 2 » Negative to BLV antibodies

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

Developed and manufactured in Spain by:

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