



INGEZIM BTV DR

Prod Ref: 12.BTV.K0

Ensayo inmunoenzimático de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos frente al virus de la Lengua Azul.

Double recognition enzymatic immunoassay for detection of antibodies specific for Blue Tongue virus

Última revisión / Last revisión: 11/5/07
Registrado por el MARM nº 1212 RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo para BTV listo para uso Vials of Positive Control serum for BTV ready to use	1	2.5 ml	2	2.5 ml
Viales de suero Control Negativo para BTV Listo para uso Vials of Negative Control serum for BTV ready to use	1	2.5 ml	2	2.5 ml
Frascos de Conjugado listo para su uso (BTV VP7-HRPO) Bottles with Conjugate ready to use (BTV VP7-HRPO)	1	30 ml	2	30 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	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
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 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 y vacunados. La base técnica del kit, es un novedoso ensayo inmunoenzimático (ELISA) denominado de doble reconocimiento, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de BTV, en este caso la proteína recombinante VP7. Cuando se añaden las muestras de suero en el caso de contener anticuerpos

específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo la proteína VP7 pero conjugada con peroxidasa. En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, muchos de ellos serán capaces de capturar la VP7-peroxidasa a la vez que permanecen unido a la VP7 fijada en los pocillos. 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.

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.
- **Sueros Controles:**
Se presentan listos para su uso. Añadir 100µl / pocillo.
- **Preparación del conjugado:**
Se presenta listo para su uso.

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar una dilución $\frac{1}{2}$ 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.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros:**
 - Añadir 50 µl de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar con muestras. Añadir a continuación 50 µl de los sueros problema a ensayar.
 - Añadir 100 µl de suero control positivo a dos pocillos y 100 µl de suero control negativo a otros dos pocillos.
 - Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable valorar las muestras por duplicado
 - Tapar la placa e incubar durante 1 hora 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 de nuevo 1 hora 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 15 minutos a temperatura ambiente (20°C-25°C). (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. 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 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 > 0.8
Control Negativo < Punto de Corte

2. CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

Punto de Corte = $0.15 \times$ Control Positivo

3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BTV), cuando su DO a 450 nm sea superior al punto de corte (15 % del control positivo).

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BTV), cuando su DO a 450 nm sea igual o inferior al punto de corte

I. 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 of infected and vaccinated animals.

The INGEZIM BTV DR kit is based on a novel immunoenzymatic assay called double recognition ELISA which is described below:

Plates are coated with VP7 protein of BTV. After adding the sample to the well, if it contains BTV specific antibodies, they will bind to the antigen coating the plate while if the sample does not

contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

When VP7 protein conjugated with peroxidase is added and sera samples contain VP7 specific antibodies, they will catch the labelled VP7. Presence or absence of labelled VP7 will be detected by addition of substrate (TMB) which, 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 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 deionised water. Once prepared, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

- **Positive and Negative controls:**

Controls are ready to use and must be tested adding 100µl / well.

- **Preparation of the conjugate:**

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

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples 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 and controls:
 - **Samples:** 50 µl of diluent to each well. Add 50 µl of each sample to be assayed.
 - **Controls:** Add 100µl of positive control to two wells and 100 µl of negative control to other two wells. We recommend running controls in duplicate.

Seal the plate and incubate 1 hour at 37°C.
3. Wash 6 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate ready to use to each well. **Seal the plate and incubate for 1 hour at 37°C.**
5. Wash 6 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Determine the mean absorbance of positive and negative controls and samples, in case of assayed the last ones in duplicate.

1. VALIDATION OF THE RESULTS

Positive Control > 0.8
Negative Control < Cut off

2. CUT OFF CALCULATION

Cut Off = 0.15 x Positive control

3. RESULTS INTERPRETATION

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific of BTV), if the OD value at 450nm is higher than the cut off (15 % of positive control).

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for BTV in the sample) if the OD value at 450nm is equal or lower than the positive cut off.

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: