

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM BTV DAS

Prod Ref: 12.BTV.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección de la proteína VP7 del *virus de la Lengua Azul*

Double antibody sandwich enzymatic immunoassay for detection of BTV's VP7 protein.

Última revisión / Last revision: 07/01/09

**Solo para investigación y sin valor diagnóstico.
Only for investigation. Without diagnostic value.**

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placas (2x8x12 pocillos) 1 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	1	-
Estándar de VP7 a las concentraciones de 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12 ng/ml listos para su uso Ready to use VP7 standards at concentrations 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12 ng/ml	5	1,5 ml
Control Negativo (Listo para su uso) Negative Control (Ready to use)	1	1,5 ml
Viales de Conjugado listo para su uso (AcM anti VP7-HRPO) Vials with Conjugate ready to use (Mab anti VP7-HRPO)	1	15 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	65 ml
Frascos de Diluyente (DE01-05) (5x concentrado) Bottles with diluent (DE01-05) (5x concentrated)	1	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	15 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	15 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 y cuantificar la proteína VP7 del virus de la lengua azul. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de doble anticuerpo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija un anticuerpo monoclonal específico de la VP7 de BTV. Cuando se añaden las muestras en el caso de contener virus, estos quedarán unidos al AcM. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico

marcado con peroxidasa, otro AcM específico de la VP7 viral. En el caso de que las muestras contuvieran virus, el conjugado se unirá a este. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

Este ELISA es capaz de detectar VP7 hasta una concentración de 3 ng/ml

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 la curva patrón 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:

- 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. 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.
- **Diluyente :**
Diluir una parte del diluyente 5x concentrado, suministrada con el kit en 4 partes de agua destilada.
- **Preparación del conjugado:**
Se encuentra listo para su uso. No diluir.
- **Preparación de la recta patrón y control negativo:**
Se encuentran listos para su uso. No diluir.

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar diluciones de la muestra en el diluyente proporcionado. Se recomienda hacer varias diluciones (normalmente de la 1/25 en adelante), ya que para cuantificar la VP7 presente en la muestra, la absorbancia obtenida ha de estar dentro de los márgenes establecidos por la recta patrón.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de la muestra y curva patrón:**
Dispensar 100 µl del control negativo así como de los 5 puntos de la recta patrón, **por duplicado**. Dispensar seguidamente 100 µl de, al menos, dos diluciones de las muestras (preparadas según instrucciones anteriores) también por duplicado. Tapar la placa e incubar **1 hora a 37°C**.
4. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **1 hora a 37°C**.
6. Lavar 4 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 450nm en los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La lectura se realizará a 450nm

A) Validación del test:

El test se considerará válido cuando la absorbancia del punto de 50 ng/ml de la recta tenga una absorbancia superior a 0.9 y el control negativo inferior al punto de 3.12 ng/ml

B) Interpretación de resultados:

El contenido de VP7 de la muestra se cuantifica de la siguiente manera:

- Construir la curva patrón (ver ejemplo)
- Determinar la concentración de VP7 de la muestra extrapolando su valor de absorbancia en dicha curva (ver ejemplo)
- Con este dato aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de VP7 en la muestra:

$$VP7 \text{ en } \mu\text{g/ml} = C \times D / 1000$$

C: es la concentración de VP7 de la muestra determinada en la curva

D: es el factor de dilución de la muestra (100, 500, 1000, 2000, etc.)

1/1000: factor que procede de la conversión de ng/ml en µg/ml

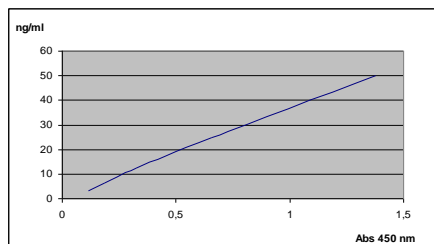
C) Información adicional

- Para que los cálculos realizados sean correctos, los valores de absorbancia de las muestras deben estar incluidos dentro de la curva. En caso contrario se debe repetir el ensayo con otras diluciones de la muestra.
- Sólo en el caso en el que el valor de absorbancia obtenido sea ligeramente superior al punto de 50 ng/ml (hasta un 15%) podrá darse por válido el ensayo

D) EJEMPLO:

- 1) DO del control negativo = 0.06
- 2) DO de los puntos de la curva:

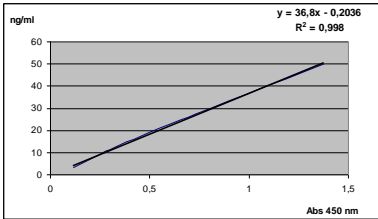
ng/ml	Abs450
50	1.38
25	0.65
12,5	0.32
6,25	0.18
3,12	0.11



- 3) La concentración de VP7 de la muestra (C) se puede extrapolar de la recta estándar usando el software apropiado. Por ejemplo:

- ✓ Software: Excel (Microsoft)
- ✓ Seleccionar tanto las concentraciones como las DO obtenidas y pinchar en "asistente para gráficos"
- ✓ Seleccione tipo de gráfico: "XY (dispersión)" y "terminar"
- ✓ Pinchar en la ventana superior "Gráfico" y seleccionar "Agregar línea de tendencia"

- ✓ En el nivel "Tipo", seleccionar "Lineal"
- ✓ En el nivel "Opciones", seleccionar " Presentar ecuación en el gráfico"
- ✓ En esta ecuación sustituir la X por la DO de la muestra para obtener el valor "C"



Muestra	Dilución(D)	DO	ng/ml (C) *	(C xD)/1000	Media (µg/ml)
B	1/1000	0,578	21,076	21,08	21.34
	1/2000	0.299	10,80	21,60	

*Obtenido reemplazando DO de la muestra por el X en la línea de tendencia

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed for detection and quantification of BTV's VP7 protein.

The INGEZIM BTV DAS kit is based on the double antibody sandwich immunoassay technique it described below:

The solid phases are plates coated with a monoclonal antibody (MAb) specific of BTV's VP7 protein. After adding the sample to the well, if it contains virus, they will bind to the MAb absorbed to the plate .If the sample

does not contain virus they will not bind to the MAb. After washing to eliminate the not adsorbed material, a MAb specific to VP7 conjugated with peroxidase is added. If there was virus in the sample, the conjugate will bind to the antigen. This union is detected after adding a substrate able to develop colour in presence of peroxidase.

This ELISA can detect up to 3 ng/ml of VP7.

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 sample.
9. For each utilisation of the Kit, control positive and negative sample 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.

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.
- **Diluent :**
Dilute 1 part of 5x concentrated diluent with 4 parts of distilled or deionised water.
- **Preparation of conjugate:**
It is ready to use. Do not dilute.
- **Preparation of standards and negative control.**
They are ready to use. Do not dilute.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Samples must be assayed at two fold dilutions from 1/25 in the diluent supplied. It is recommended to make several dilutions because the absorbance obtained for VP7 detection must be within the limits established by the Patron Curve.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. **Sample and standards addition:**
Add to the respective wells 100 µl of negative control and the 5 standards in duplicate. Add 100 µl of, at least, two dilutions of the samples (prepared as it is described above) in duplicate.
3. Seal the plate and incubate **1 hour at 37°C.**
4. Wash 4 times following the described procedure.

5. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and incubate **1 hour at 37°C**.
6. Wash 4 times following the described procedure.
7. Add 100 µl of substrate to each well and incubate for **10 minutes** at room temperature. (Count the time since the first well had been filled). .
8. Add 100 µl of stop solution to each well. ATTENTION: The stop solution must be dispensed in the same order in which the substrate was added.
9. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Read at 450 nm

A) Validation of the test:

The test will be valid if:

- The absorbance obtained with the point of 50 ng/ml standard is higher than 0.9 **and**
- The absorbance obtained with the negative control is lower than the absorbance obtained with the point of 3.12 ng/ml

B) Interpretation of the results:

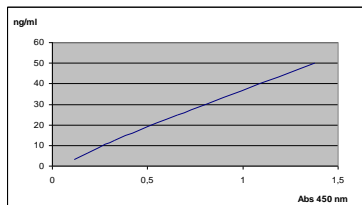
The amount of VP7 contained in the sample is quantified in the following way:

- Make the Patron Curve (see the example)
- Determine the concentration of VP7 in the sample extrapolating its OD value in the curve (see the example).

D) Example:

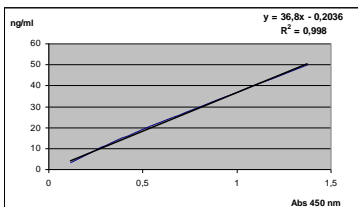
1. Negative control OD = 0.06
2. Standards OD:

ng/ml	Abs450
50	1.38
25	0.65
12,5	0.32
6,25	0.18
3,12	0.11



3. The concentration of VP7 in the sample (C) can be extrapolated in the curve by using the appropriated software. For example:

- ✓ Software: Excel (Microsoft)
- ✓ Select the cells with the absorbance and concentration and clic "Graphic assistance"
- ✓ Select "Type of graphic": "XY (dispersion)" and "finish"
- ✓ Click on "Graphic" and select " Add tendency line"
- ✓ In "Type", select "Lineal"
- ✓ In "Options", select " Show formula in the graphic"
- ✓ In this formula, substitute x for the OD of the sample to obtain "C"



Sample	Dilution(D)	OD	ng/ml (C)*	(C xD)/1000	Mean (µg/ml)
B	1/1000	0,578	21,076	21,08	21.34
	1/2000	0,299	10,80	21,60	

*Obtained by replacing x for the OD of the sample in the tendency line

- Substitute this data (C) in the formula in order to determine the amount of VP7 of the sample.

$$\text{VP7 in } \mu\text{g/ml} = \text{C} \times \text{D} / 1000$$

C: concentration of VP7 contained in the sample determined in the curve

D: is the factor of dilution (100, 500, 1000, etc.)

1/1000: factor from the conversion: ng/ml to µg/ml

C) Additional information

- In order to calculate correctly, the OD values of the samples must be within the limits of the curve. On the contrary, the assay must be repeated with other dilutions of the sample.
- Just in case that the OD value obtained be slightly higher than the point of 50 ng/ml (until 15%) the assay could be considered valid

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:

