



INGEZIM IBR 2.0

Prod Ref: 12.BHV.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección y/o titulación de anticuerpos frente al Herpesvirus bovino tipo I (BoHV-1) causante de la *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina* en muestras bovinas (suero, plasma y leche).

Indirect immunosorbent assay for the detection and / or titer of antibodies to Bovine Herpesvirus type I (BoHV-1) causing Infectious Bovine Rhinotracheitis in bovine samples (serum, plasma and milk).

Última revisión / Last revision: 28-05-2018
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 0526-RD

Version 2.0 (28-05-18):

- Cambio en la dilución de trabajo de los sueros / *Change of serum working dilution*
- Eliminación del protocolo largo para leche / *Delection of large incubations for milk*
- Dos conjugados diferentes dependiendo de la matriz / *2 conjugates*
- Unificación de la dilución de uso de controles y muestras / *Same dilution of control & sera*
- Cambio de diluyente DE01-05 por DE01-01 / *Change of diluent concentration*
- Interpretación de resultados en s/p / *Result interpretation in s/p*
- Eliminación de placas de antígeno negativo / *No plates with negtaive antigen*

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Unid	vol	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras, tapizadas con BoHV1 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with BoHV1	2	-	5	-
Viales conteniendo Control Positivo para BoHV1 Vials containing BoHV1 Positive Control	1	0.25 ml	2	0,25 ml
Viales conteniendo Control Negativo para BoHV1 Vials containing BoHV1 Negative Control	1	0,25 ml	2	0,25 ml
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x para ensayo con sueros (tapa amarilla). Vials with 100x concentrated conjugate (MAb peroxidase conjugated) to use with sera (yellow cup)	1	300 µl	2	300 µl
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x para ensayo con leches (tapa verde). Vials with 100x concentrated conjugate (MAb peroxidase conjugated) to use with milk (green cup)	1	300 µl	2	300 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente de suero (DE01-01) Bottles containing sample diluent (DE01-05)	1	65 ml	1	65 ml
Frascos conteniendo diluyente de conjugado (DE08-01) Bottles containing conjugate diluent (DE08-01)	1	65 ml	1	65 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stop solution	1	65 ml	1	65 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 BoHV1 (*Bovine Herpesvirus 1*), en ganado bovino afectado de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) o Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV). El método se basa en la técnica de inmunoensayo enzimático indirecto que se describe a continuación: Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno específico del Herpesvirus Bovino tipo 1. Sobre el antígeno se dispensan las muestras. Si estas contienen anticuerpos específicos del virus quedarán unidos a él. Tras un paso de lavado para retirar los componentes 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. Esta unión se revela con un sustrato adecuado a la peroxidasa dando una reacción colorimétrica medible. Así la presencia de color indicará la presencia de anticuerpos frente al BoHV-1 en la muestra ensayada.

El ensayo es apto para su uso tanto con sueros y plasma como con leches, ya sean estas últimas individuales o en tanque.

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

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C). **Los controles, una vez abiertos**, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

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 mantener la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

• **Sueros:**

Las muestras problema se utilizarán a la dilución 1/5. Esta dilución se puede realizar en el mismo pocillo añadiendo en primer lugar 80 µl del diluyente de suero (DE01-01) y en segundo lugar 20 µl de la muestra.

• **Leche (individual y en tanque):**

Las muestras de leche deben ensayarse sin dilución previa (100 µl/pocillo). Pueden utilizarse frescas, refrigeradas o previamente congeladas. Para eliminar

la interferencia de los lípidos, las leches deben ser desnatadas parcialmente ya sea por centrifugación (15 min a 2000xg), o dejándola una noche a 4°C hasta observar la formación de una capa lipídica en la superficie. Se deberá recoger muestra por debajo de esa capa de lípidos y esa será la que se use en el ensayo. También se puede usar lactosuero que es el líquido transparente que se observa cuando se corta la leche. Se consigue fácilmente congelando y descongelando la muestra

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 más 960 ml de agua destilada).
- **Preparación de los controles (+) y (-)**

Los controles se diluirán 1/5 y se utilizarán a esta dilución, ya se haga el ensayo con sueros o con leches. Si se prevé una utilización parcial del kit, se recomienda alicuotear y almacenar los controles a -20°C.

- **Preparación del conjugado:**
Realizar una dilución **1/100** del conjugado concentrado suministrado en el kit con diluyente de conjugado DE08-01

Procedimiento para muestras de suero: conjugado de tapa amarilla

Procedimiento para muestras de leche: conjugado de tapa verde

ATENCIÓN: preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado concentrado) a temperatura ambiente
2. **Adición de los sueros (sueros o leches):**
3. Dispensar 100 µl/pocillo de las muestras preparadas según instrucciones de apartado V. Añadir en último lugar los controles diluidos tal como se indica en el apartado VI. Se recomienda valorar tanto muestras como controles por duplicado. Incubar **45 min a 37°C**.
4. Lavar 4 veces según procedimiento anterior.
5. **Adición del conjugado:** Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo, preparado según se especifica en apartado VI. **Incubar 45 min a 37°C**.
6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
7. **Adición del sustrato:** Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato.
8. **SUEROS: Incubar durante 15 minutos. LECHEs: Incubar durante 5 minutos.**
9. Las incubaciones se realizarán a temperatura ambiente y en oscuridad. 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.
10. 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.
11. Leer los valores de DO a 450 nm 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 de DO obtenidos en los dos pocillos para control positivo y de los valores de DO obtenidos en los dos pocillos para el control negativo.

A. Validación del test:

El test se considerará válido cuando:

SUEROS

DO Control Positivo (dilución 1/5) > 0.8
DO Control Negativo (dilución 1/5) < 0.3

LECHES

DO Control Positivo (dilución 1/5) > 1.0
DO Control Negativo dilución 1/5) < 0.40

Cálculo de puntos de corte:

SUEROS

Calcular la relación entre la muestra y el control positivo (M/P)

M/P: (M-CN)/(CP-CN)

Donde M es el valor de DO de la muestra, CP es el valor de DO del control positivo y CN el valor de DO del control negativo.

Cut off positivo/negativo

El punto de corte será $M/P = 0.18$

Muestras con M/P iguales o superiores a 0.18 serán consideradas positivas y con M/P inferiores serán negativas.

LECHES

Cut off positivo/negativo

Punto de corte será la DO Control negativo + **0.1**.

Muestras con DO iguales o superiores al punto de corte serán consideradas positivas y con DO inferiores serán negativas.

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed to detect specific antibodies against BoHV1 (Bovine Herpesvirus 1) in affected cattle of infectious bovine rhinotracheitis (IBR). This Kit is based on an indirect enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). The sample is added to each well. After incubation we add a monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to bovine immunoglobulins. If the sample contains antibodies against the virus, the

conjugate will bind to the plate, whereas if it does not contain specific antibodies no binding of the conjugate will be appreciated.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled conjugate by adding the substrate which, in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

The assay is suitable for use both as sera and milk, whether individual or tank

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 kits reagents.
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 samples 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 samples must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handle whit 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. **Once opened**, control are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to make aliquots and store them at -20°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 SAMPLES:

Sera:

Samples must be diluted 1/5 in sample diluent DE01-01. The dilution can be done in the same well by first adding 80 µl of diluent and after that 20µl of serum.

Milk (individual and tank)

Milk must be tested undiluted. Fresh, refrigerated or previously frozen milk may be tested. To eliminate interference from lipids, partially skimmed milk should be either by centrifugation (15 min at 2000xg) or leaving overnight at 4°C to observe the formation of a lipid layer on the surface. Sample should be collected under the layer of lipids and that will be the one used in the assay. To obtain whey, freeze/thaw the milk sample.

VI. 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.

Controls

Controls will be diluted 1/5 in diluent DE01-01 and will be used at this dilution whether the test is done with sera or with milk.

Once opened we recommend freezing the control at -20°C if they are not going to be used in a short period of time.

Preparation of the conjugate: to make immediately before use:

Dilute the needed quantity of conjugate provided in the Kit 1/100 with conjugate diluent (DE08-01)

For serum samples (conjugate with yellow cup)
For milk samples (conjugate with green cup)

ATTENTION: Shake the solution before use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except concentrated conjugate) must be equilibrated at room temperature before use
2. **Sample addition (serum or milk):**
3. Dispense 100 µl/well of each sample prepared as indicated in section V. Add last dilute controls as indicated in section VI. It's recommended to evaluate samples and controls in duplicate. **Incubate 45 min at 37°C.**
4. Wash 4 times following the described procedure.
5. Add 100 µl of conjugate (prepared as described in section VI) to each well. **Incubate the plate for 45 at 37°C.**
6. Wash 5 times following the described procedure.
7. Add 100 µl of substrate solution, to each well. Incubate: **SERUM: 15 min and MILK: 5 min**
8. Incubations must be performed at room temperature in the dark. Count the time from the addition of the solution to the first well. It's recommended using a multichannel pipette to expedite this process as much as possible
9. Add 100 µl of stop solution to each well. **CAUTION:** The stop solution must be dispensed in the same order as the substrate solution was added.
10. Read the OD 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**. In case that samples had been tested in duplicate, it must be considered the average of the two OD values obtained. Similarly, the arithmetic mean of the values obtained in the two wells for positive control and two wells for the negative control should be calculated.

A. Validation criteria:

The test can be considered valid if:

SERA:

- The OD of Positive Control (1/5 dilution) > 0.8
- The OD of Negative Control (1/5 dilution) < 0.3

MILK:

- The OD of Positive Control (1/5 dilution) > 1.0
- The OD of Negative Control (1/5 dilution) < 0.40

B. Cut off calculation: C.

SERUM:

First, calculate the S/P ratio (sample/positive) using the following formula

$$S/P = (S-NC) / (PC-NC)$$

Where S is the OD sample value and NC and PC are the OD values of negative and positive controls respectively.

• Positive/Negative Cut Off

The cut-off value is 0.18.

Samples showing S/P values equal or higher than the cut off are considered positive and samples showing S/P values lower than the cut off are considered negative.

MILK:

• Positive/Negative Cut Off

Mean of OD450 of Negative control + 0.1.

Samples showing OD values equal or higher than the cut off are considered positive and samples showing OD values lower than the cut off are considered negative.

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2

Distributed in

by: