



## INGEZIM IBR Compac 2.0

Prod Ref: 12.BHV.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a la glicoproteína gB del *virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (BoHV)* en muestras de suero y leche bovinas.

Blocking immunoenzymatic assay for the detection of specific antibodies to the gB glycoprotein of *Infectious Bovine Rinotracheitis virus (BoHV)*, in bovine milk and serum samples.

Última revisión / *Last revision*: 01-06-18  
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 0962 RD

Version 01-06-18: Uso de muestras de leche /*use of milk samples*

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. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo para BoHV1 Vials containing BoHV1 Positive Control sera	1	600 µl	2	600 µl
Viales conteniendo suero Control Negativo para BoHV1 Vials containing BoHV1 Negative Control sera	1	600 µl	2	600 µl
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated (MAb peroxidase conjugated)	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 (DE01-01) Bottles containing diluent (DE01-01)	1	125 ml	1	125 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 TECNICO 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), y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero y leche tanto de animales infectados, como de animales vacunados. La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno de BoHV1. Cuando las muestras se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado marcado con peroxidasa. (Anticuerpo

monoclonal específico de la proteína gB del 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.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición del sustrato adecuado, el cual desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa (es decir en presencia del monoclonal conjugado con peroxidasa). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos del BoHV1 y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

## 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). **Una vez abiertos**, 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 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 debe mantenerse 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 1/2. Esta dilución se puede realizar en el mismo pocillo añadiendo en primer lugar 50 µl del diluyente de suero (DE01-01) y en segundo lugar 50 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 en 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua).

- **Sueros Controles:**

Se utilizarán a la dilución ½ si el ensayo se realiza con sueros y a la dilución 1/5 si el ensayo se realiza con leches.

**¡ATENCIÓN!** Una vez abiertos, los controles son estables durante 1 mes conservados entre +2°C y +8°C. Si se prevé su uso a más largo plazo se recomienda su congelación a -20°C en alícuotas.

- **Preparación del conjugado:**

Realizar una dilución 1/100 del conjugado 100x suministrado en el kit con diluyente:

- 10 µl de conjugado 100x concentrado en 1 ml de diluyente, es la cantidad necesaria y suficiente para una tira.
- 110 µl de conjugado 100x concentrado, en 11 ml de diluyente, es cantidad necesaria y suficiente para una placa completa.

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

## VII. PROCEDIMIENTO

Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.

### 1. Adición de las muestras:

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.

2. Tapar la placa e incubar **durante 1 hora a 37°C en el caso de que las muestras sean sueros**
3. Tapar la placa e incubar **durante 16-20 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda en el caso de que las muestras sean leches**
4. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente. En el caso de que queden cercos

de leche en los pocillos, realizar lavados adicionales hasta su eliminación

4. Añadir 100 µl de conjugado, preparado según se especifica en apartado VI, a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **30 min. a 37°C**.
5. Lavar 5 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** en oscuridad. (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. **ATENCIÓN:** 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

### A. Validación del test:

- El valor de absorbancia (DO450 nm) del suero control Negativo debe ser mayor de 0,750.
- Ha de cumplirse la siguiente relación:

$$\frac{\text{Control Positivo}}{\text{Control Negativo}} < 0.3$$

### B. 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.

Para cada una de las muestras se calculará el porcentaje de bloqueo, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{DO_{\text{Control Neg}} - DO_{\text{Muestra}}}{DO_{\text{Control Neg}} - DO_{\text{Control Pos}}} \times 100\%$$

#### Suero:

- Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BoHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o superior al 30%.
- Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BoHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o inferior al 25%.
- Las muestras que presenten porcentajes de bloqueo entre ambos valores se considerarán **DUDOSAS** y en estos casos se recomienda testar de nuevo al animal transcurridas 3 semanas.

#### Leche y lactosuero:

- Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BoHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o superior al 40%.
- Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BoHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea inferior al 40%.
-

## INGEZIM IBR COMPAC 2.0

### 12.BHV.K3

## I. TECHNICAL BASIS

The Kit has been designed to detect specific antibodies to BoHV1 in cattle sera and milk samples. This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (Blocking Elisa). The technique is briefly described below:

The BoHV-1 antigen is fixed on a solid support (polystyrene plate). The samples are added to each well. After an incubation period, a specific monoclonal antibody (peroxidase conjugated) specific to gB protein of the BoHV-1 is added. If the serum sample does not contain antibodies against the virus, the conjugate will bind to the plate, whereas if it contains specific antibodies to BoHV-1, these

antibodies will bind to the antigen on the plate, blocking the binding of the conjugate, which will not occur.

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

Due to the high specificity of the monoclonal used as the conjugate, the assay has high specificity and sensitivity indexes.

## 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 reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
10. The stop solution is a strong acid and therefore must be handled with care. In case of an accidental contact with skin, rinse gently with water.
11. The substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored between 2°C and 8°C.

**Once opened**, the control sera are stable for one month between +2°C and +8°C. If they are not going to be used during this period, we recommend storing them below -20°C

## IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps can be done using an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

## V. PREPARATION OF SAMPLES:

### **Sera:**

Samples must be diluted 1/2 in sample diluent DE01-01. The dilution can be done in the same well by first putting 50 µl of diluent and secondly 50 µl of serum .

### **Milk (individual and tank)**

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 concentrated washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml de concentrated solution and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.

• **Preparation of controls:**

Controls must be diluted ½ in diluent DE01-1 if the samples are sera, and diluted 1/5 if the samples are milk.

ATTENTION! Once opened, the control sera are stable for one month when stored between +2°C and +8°C. For long term storage, we recommend making aliquots and storing them at -20°C.

• **Preparation of the conjugate: (to be prepared immediately before use):**

Dilute 1/100 the required volume of conjugate with the diluent provided with the kit:

The necessary and sufficient amount of conjugate for a complete plate is 110 µl of conjugate with 11 ml of diluent. The necessary and sufficient amount of conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate with 1 ml of diluent.

Shake the solution well before use. Prepare only the amount of conjugate necessary to run the test, as the remaining solution must be discarded.

## VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (20-25°C) (except conjugate).
1. **Adding the samples (serum or milk):**  
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 Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C if the samples are sera and 16 - 20 h at room temperature in humidity chamber if the samples are milk**
2. Wash 5 times following the procedure previously described.
3. Add 100 µl of the conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Shake the plate carefully to help the correct homogenisation of the components mixed on each well. Seal the plate and **incubate for 30 min at +37°C.**
4. Wash 5 times following the procedure previously described.
6. Add 100 µl of the substrate solution, to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature, in a dark place.**
7. Add 100 µl/well of the stop solution.
8. Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

### A. Validation criteria:

- OD of Negative control >0.750
- To validate the assay, the ratio:

OD (positive Control) / OD (negative control)  
must be lower than 0.3

### B. Results Interpretation:

When running the test in duplicate, the OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of the OD values in both wells.

The blocking percentage for each sample must be calculated as follows:

$$\text{blocking \%} = \frac{\text{OD neg Control} - \text{OD sample}}{\text{OD neg Control} - \text{OD pos Control}} \times 100$$

### Serum

- Samples with a blocking % lower than 25% must be considered as Negative.
- Samples with a blocking % higher than 30% will be considered as Positive.
- Samples with blocking % between both should be considered as doubtful. We recommend re-testing after 3 weeks.

### Milk

- Samples with a blocking % lower than 40% must be considered as Negative.
- Samples with a blocking % higher or equal than 40% will be considered as Positive.

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](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)

Distributed in by:



IT-73840  
IT-73780



ISO 14001:2015  
9191.INGE



ISO 9001:2015  
9175.ING2