**INgezim® IBR gE**

Prod Ref: 12.IBE.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente a la glicoproteína gE del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (BHV-1) en suero, plasma, leche y lactosuero bovino.

Blocking immunoenzymatic assay for the detection of specific antibodies to gE glycoprotein of the Infectious Bovine Rinotracheitis virus (BHV-1), in bovine serum, plasma, milk and whey samples.

Version Doc:28.05.2024

Nº de registro en España: 3467-RD

Registration number in Spain: 3467-RD

**COMPOSICIÓN DEL KIT**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***REACTIVO*** | ***2 Placas*** | ***5 Placas*** |
| Uni. | Vol. | Uni. | Vol. |
| Placas de microtitulación | 2 |  | 5 |  |
| Viales de Control Positivo | 1 | 600µL | 2 | 600µL |
| Viales de Control Negativo | 1 | 600µL | 2 | 600µL |
| Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar | 1 | 30mL | 2 | 30mL |
| Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x | 1 | 125mL | 1 | 125mL |
| Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar | 1 | 30mL | 1 | 60mL |
| Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar | 1 | 65mL | 1 | 65mL |
| Frascos conteniendo Diluyente (DE37-01), listo para usar | 1 | 15mL | 2 | 15mL |

**OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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 50-250 mL.

Lector ELISA (filtro de 450 nm)

**FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT**

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente a la proteína gE del BHV1 (Bovine herpesvirus 1), en ganado bovino afectado de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) o Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y es capaz de detectar anticuerpos en animales infectados y no de animales vacunados con la vacuna gE delecionada. 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 BHV1. 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 específico marcado con peroxidasa. (anticuerpo monoclonal específico para la proteína gE del virus). En el caso de que las muestras tuvieran 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 BHV1 y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

**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 y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. 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.
8. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

**NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS**

Mantener todos los componentes entre +2ºC y +8ºC.

**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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de NaOH 0,1M, ya que las muestras problema podrían contener agentes infectivos.
* Distribuir unos 300 µL de solución de lavado por pocillo.
* Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
* Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
* Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el 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.

**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

**Suero y plasma:**

Realizar una dilución 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.

**Leche (individual y tanque):**

Las muestras de leche o tanque deben ensayarse sin dilución previa. Pueden utilizarse frescas, refrigeradas o previamente congeladas. Las muestras de leche deben ser centrifugadas previamente durante 15 min a 2000 xg para eliminar la capa lipídica, o esperar a que la capa lipídica se forme en la superficie. Se deberá recoger muestra por debajo de esa capa de lípidos. Para la obtención de lactosuero, congelar/descongelar la muestra de leche.

**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 (40 mL de solución concentrada más 960 mL de agua).

**Sueros Controles:**

Se tratan como las muestras, añadiendo 50 µL por pocillo.

**Preparación del conjugado:**

El conjugado se presenta listo para su uso. No necesita preparación.

**PROCEDIMIENTO**

1. **Adición de los sueros o plasma:**
* Añadir 50 µL de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar.
* Añadir otros 50 µL de cada control y de cada muestra sobre los pocillos.
1. **Adición de las leches:** Añadir 100 µL de las muestras de leche problema a ensayar. Utilizar una punta limpia para cada muestra
2. Tapar la placa e incubar durante 16-24 horas a 4ºC
3. Equilibrar el bote de conjugado a temperatura ambiente (entre +20ºC y +25ºC).
4. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µL de conjugado listo para su uso. **Tapar la placa e incubar 30 min a temperatura ambiente (entre+20ºC y +25ºC).**
6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
7. Añadir 100 µL de sustrato a cada pocillo e incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente** en oscuridad. (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.

**LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

**VALIDACIÓN DEL TEST:**

* El valor de absorbancia (DO 450 nm) del suero control Negativo debe ser mayor de 0,750.
* Ha de cumplirse la siguiente relación:

|  |  |
| --- | --- |
|  Control Positivo | < 0,25 |
| Control Negativo |

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará como resultado 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:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| % Bloqueo = 100 - ( | Abs Muestra | ) x100 |
| Abs Control negativo  |

**MATRIZ SUERO Y PLASMA**

* Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea superior al 55%.
* Las muestras se considerarán **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o inferior al 55%.

**MATRIZ LECHE**

* Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a BHV1), cuando su porcentaje de bloqueo sea igual o superior al 30%.
* Las muestras se considerarán **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a BHV1), 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.

**KIT COMPOSITION**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***REAGENT*** | ***2 Plates*** | ***5 Plates*** |
| Uni. | Vol. | Uni. | Vol. |
| Microtitration plates | 2 |  | 5 |  |
| Vials with Positive Control | 1 | 600µL | 2 | 600µL |
| Vials with Negative Control | 1 | 600µL | 2 | 600µL |
| Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use | 1 | 30mL | 2 | 30mL |
| Bottles with Washing Solution 25x concentrated | 1 | 125mL | 1 | 125mL |
| Bottles with Substrate (TMB), ready to use | 1 | 30mL | 1 | 60mL |
| Bottles with Stop Solution, ready to use | 1 | 65mL | 1 | 65mL |
| Bottles with Diluent (DE37-01), ready to use | 1 | 15mL | 2 | 15mL |

**OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT**

Distilled or deionized 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)

**TECHNICAL BASIS**

The Kit has been designed to detect in a very easy way specific antibodies to the gE protein of BHV1 in cattle samples. This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay **(Blocking Elisa).** The technique is briefly described below:

The BHV-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 the gE protein of the BHV-1 is added. If the serum or plasma sample does not contain antibodies against the virus, the conjugate will bind to the plate, whereas if it contains specific antibodies to the gE BHV-1, these antibodies will bind the antigen on the plate avoiding therefore the binding of the conjugate.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, the presence or absence of the 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 antibody used as conjugate, the assay shows high specificity and sensitivity indexes and it’s possible to distinguish between infected animals and negative or vaccinated animals with gE-deleted vaccines.

**PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS**

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used and never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

**STORAGE OF COMPONENTS**

Keep all the reagents between +2ºC and +8ºC.

**INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS**

The washing steps could be done using an automatic washing machine or a multichanel 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 turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
* 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. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry.
* After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

**PREPARATION OF SAMPLES**

**Serum and plasma:**

Serum and plasma samples must be tested at 1/2 dilution in the diluent provided in the kit. This dilution can be done directly in each well by adding 50 µL of the serum diluent and 50 µL of the serum sample and mixing properly

**Milk (individual and tank):**

Must be tested undiluted. Fresh, refrigerated or previously frozen milk may be tested. Milk samples must be centrifuged for 15 minutes at 2000 xg to remove the lipid layer or leave the milk samples until the fat layer is formed on top of the sample. Pipette under the fat layer. To obtain whey, freeze/thaw the milk sample.

**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 +2ºC and +8ºC.

**Preparation of controls:**

Controls must be handled as samples (add 50 µL/well).

**Preparation of the conjugate:**

The conjugate is ready to use, and it is not necessary to be diluted.

**TEST PROCEDURE**

1. **Serum or plasma addition:**
* Add 50 µL of the diluent to all of the wells to be used (including the ones used for the positive and the negative control serum).
* Add 50 µL of sample and the positive and negative control.
1. **Milk addition:** Add 100 µL of milk samples to each well of the plate. For high accuracy it is recommended to run samples and control in duplicate.
2. Seal the plate and incubate for 16-24 hours at 4ºC
3. Bring conjugate bottle to **room temperature (20ºC to 25ºC).**
4. Wash 5 times following the procedure previously described
5. Add 100 µL of the conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 30 min at room temperature (20ºC to 25ºC).**
6. Wash 5 times following the procedure previously described.
7. Add 100 µL of the substrate solution to each well. Keep the plate for **30 min at room temperature, in a dark place.**
8. Add 100 µL /well of the stop solution.
9. Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

**READING AND RESULT INTERPRETATION**

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

**VALIDATION CRITERIA:**

* The OD of the Negative control > 0.750
* To validate the assay the ratio OD (positive control) /OD (negative control) must be lower than 0.25

**RESULTS INTERPRETATION:**

When running samples in duplicate, the OD value for each sample should be calculated as the arithmetic mean of both values.

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Blocking = 100 - ( | Abs Sample | ) x100 |
| Abs Neg. control |

**SERUM AND PLASMA:**

* All samples with a blocking % lower than or equal to 55% must be considered as **NEGATIVE.**
* All samples with a blocking % higher than 55% will be considered as **POSITIVE.**

**MILK:**

* All samples with a blocking % lower than 25% must be considered as **NEGATIVE**.
* All samples with a blocking % higher than 30% will be considered as **POSITIVE**.
* Samples with blocking % between 25% and 30% should be considered as **DOUBTFUL.** It is recommended retesting the animals again after 3 weeks.



Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactered in Spain by:

|  |  |
| --- | --- |
| GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta28037- MADRID (SPAIN)Tlf: +34 91368.05.01/04Fax: +34 91 408.75.98E-mail:info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com[www.goldstandarddiagnostics.com](http://www.goldstandarddiagnostics.com)9191.INGE9175.INGE | Distribuido en porDistributed in by |