



## INGEZIM BRSV COMPAC

Prod Ref: 12.BRS.K3

Ensayo inmunoenzimático de competición para la detección de anticuerpos específicos frente al virus respiratorio sincitial bovino en muestras de suero.

Competition immunoenzymatic assay for the specific detection of antibodies to *Bovine respiratory syncytial virus* in cattle sera samples.

Última revisión / Last revision: 27-05-13

---

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 inactivado Vials containing Positive Control sera	1 vial	300 µl	2 viales	300 µl
Viales conteniendo suero Control Negativo Vials containing Negative Control sera	1 vial	300 µl	2 viales	300 µl
Viales conteniendo conjugado específico concentrado 100x Vials containing specific conjugate 100x concentrated	1 vial	250 µl	2 viales	250 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente DE01-01 Bottles containing diluent DE01-01	1 frasco	125 ml	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containig substrate (TMB) ready to use	1 frasco	30 ml	1 frasco	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stoping solution	1 frasco	60 ml	1 frasco	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 TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en lo que se denomina un inmunoensayo de competición. A continuación de describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido se encuentra adsorbido el antígeno inactivado (BRSV). Sobre la placa se añaden las muestras y seguidamente un anticuerpo monoclonal (AcM) específico de BRSV conjugado con peroxidasa. En caso de que la muestra sea positiva los anticuerpos específicos de BRSV competirán con el AcM por su unión al antígeno, impidiendo total o parcialmente la unión de éste. Por el contrario en caso

de que la muestra sea negativa el AcM se unirá libremente al antígeno. Después de un paso de lavado la presencia del AcM-peroxidasa, se revela tras la adición de un sustrato adecuado el cual producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída en un espectrofotómetro. De esta manera la presencia de color indicará ausencia de anticuerpos específicos de BRSV en el suero ensayado, mientras la ausencia o disminución de color corresponderá a muestras seropositivas.

## 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 and +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:

Se recomienda la **TITULACIÓN** de los sueros realizando diluciones de factor 2 a partir de la dilución 1/2.

Todas las diluciones se realizarán en el diluyente proporcionado.

En caso de realizar **SCREENING**, se recomienda ensayar cada muestras por duplicado a la 1/2.

Las diluciones pueden hacerse aparte o en los mismos pocillos donde van a ser ensayadas teniendo siempre la precaución de tocar lo menos posible el fondo del pocillo y teniendo presente que el volumen final de la muestra en el pocillo ha de ser de 50 µl ya que sobre ella ha de añadirse el conjugado.

## VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Solución de lavado:**  
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada. (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada)
- **Preparación de los controles (+) y (-):**  
Los controles se usarán a la 1/2 ( como las muestras)
- **Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización.**  
Realizar una dilución 1/100 en diluyente

suministrado:

- Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 5 µl de conjugado concentrado hasta 0.5 ml de diluyente.
- Para una placa completa recomendamos diluir 60 µl de conjugado hasta 6 ml de diluyente.

Homogenizar bien la solución antes de su utilización. Preparar únicamente el volumen de conjugado, estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar a temperatura ambiente las placas o tiras a utilizar y el resto de los componentes del kit, excepto el conjugado 100x que siempre ha de mantenerse entre +2°C and +8°C.

2. Adición de muestras:

En caso de **TITULACIÓN** añadir a la placa o a las tiras que se estén ensayando 50 µl de diluyente de suero. Sobre los primeros pocillos dispensar 50 µl de la muestra, homogeneizar y a continuación pasar 50 µl al siguiente pocillo. Repetir la acción hasta el último pocillo del que se descartaran 50 µl. En el caso de realizar varias muestras a la vez se recomienda el uso de una pipeta multicanal para la agilización del proceso.

En caso de realizar únicamente **SCREENING** se recomienda añadir directamente sobre el pocillo 25 µl de diluyente en primer lugar y 25 µl de los sueros a continuación.

En cualquiera de los casos, siempre se añadirán los sueros controles, positivo y negativo,

suministrados en el kit, tratándose del mismo modo que las muestras.

3. Añadir a continuación 50 µl de conjugado preparado según Instrucciones anteriores a cada pocillo. Agitar suavemente la placa para una correcta homogeneización de los reactivos Tapar la placa e incubar **30 minutos a 37°C.**
4. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente.
5. Añadir 100 µl de sustrato por pocillo. Mantener la reacción **10 minutos a temperatura ambiente** y en oscuridad.
6. Añadir 100 µl de solución de frenado con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo en el mismo orden que se añadió el sustrato.
7. Leer a longitud de onda de 450nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realiza a una longitud de onda de **450 nm.**

### A. Validación del kit :

El kit se considerará válido cuando :

- DO Control Negativo se encuentre entre 0.8 y 1.5
- DO Control Positivo sea menor de 0.3

### B. Cálculo del Punto de Corte +/- :

Se calcula el punto de corte como:

$$\text{Punto de Corte} = \text{CN} - [(\text{CN}-\text{CP}) \times 0.40 ]$$

Donde CN es la absorbancia del control negativo y CP la del control positivo.

### C. Interpretación de Resultados :

- Todo suero que presente un valor de DO superior al Punto de Corte se considerará negativo
- Las muestras cuyo valor de DO no supere el punto de corte, deberán considerarse positivas
- En el caso de realizar el ensayo de **TITULACIÓN**, el título de la muestra será la última dilución cuyo valor de DO se encuentre por debajo del punto de corte.

Se recomienda testar de nuevo los sueros con valores de absorbancia  $\pm 5\%$  del valor del punto de corte.

## I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a competitive enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:

We fix the BRSV antigen on a solid support (polystyrene plate). Serum samples and a peroxidase conjugated BRSV-specific monoclonal antibody (Mab) are added into wells. If sample contains antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on plate blocking the binding of the conjugated Mab. On the other hand, if the sample does not contain antibodies to the BRSV the conjugated Mab will bind to the antigen.

After washing to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence of the conjugated Mab after addition of a substrate-TMB solution. A colorimetric reaction will develop in the case of absence of antibodies in the serum sample and no colour (indicating no binding of the Mab) in case of presence of antibodies against the virus in the assayed sample.

The aim of this kit is to provide the users with a reliable and automatizable diagnostic technique for this disease.

## 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. 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 serum must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

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

**Once opened**, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to 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:

We recommend the **TITRATION** of the samples starting from dilution 1/2. Dilutions can be done in the same or in different (blank) plate, keeping in mind that the final volume of the diluted sample in the well

should be 50 µl because you must add 50 µl of conjugate to the same well.

For **SCREENING**, test samples at dilution 1/2.

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrated washing solution with 24 parts of distilled or deionized water (e. g. 40 ml of concentrate plus 960 ml of water) When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and 8°C.

- **Preparation of the control sera:**

We recommend distributing the control sera in aliquots and storing it at -20°C till use.

Control sera needs to be assayed diluted 1/2 with diluent. This dilution could be done directly on each well of the plate by adding 25 µl of serum and 25 µl of diluent.

- **Preparation of the conjugate: to make immediately before use:**

Dilute the needed quantity of conjugate provided in the kit 1/100 into diluent:

→ The necessary and sufficient quantity for a complete plate is 60 µl of conjugate with 6 ml of diluent.

→ The necessary and sufficient quantity for an 8 well strip is 5 µl of conjugate with 0,5ml of diluent.

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

## VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Samples and control sera addition:

**FOR TITRATION:**

Add 50 µl of diluent to each well and 50 µl of samples to the wells of row A (A1.... A12). Then, make two-fold dilutions of each serum up to row H (final dilution is 1/256). Remove 50 µl from the wells of row H. Negative and Positive controls are tested only at 1/2 dilution in duplicate wells (e.g. wells H1, H2 and H3, H4).

**FOR SCREENING:**

Add 25 µl of diluent and 25 µl of sample. Do the same with controls.

3. Add 50 µl of conjugate prepared as previously described to each well. Shake carefully the plate to

help the correct homogenisation of the components. Seal the plate and incubate for **30 min at 37°C**.

4. Wash 6 times following the procedure.
5. Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate in darkness for **10 min at room temperature**.
6. Add 100 µl of stop solution to each well.
7. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULTS INTERPRETATION

The reading must be done at **450 nm in an ELISA reader**.

### A. Validation of the test:

The test is considered valid if:

→ The OD for the Positive Control (PC) < 0.3

→ The OD for the Negative Control (NC) range between 0.8 and 1.5

### B. Interpretation of the results:

#### A. Cut Off calculation:

Cut Off = NC - [(NC - PC) x 0.4]

**B. Results Interpretation:**

When you are running duplicate samples, OD values will be calculate for each sample as the arithmetic mean of both values.

→ All samples with OD higher than CUT OFF value must be considered as **negative** to BRSV antibodies.

- All samples with OD values lower than CUT OFF value must be considered as **positive** to BRSV antibodies.
- Samples with OD values ranging  $\pm 5\%$  of cut off value should be considered doubtful and retested.
- Titre of a sample will be the last dilution showing OD value lower than 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](http://www.ingenasa.es)

Distributed in by:

