

INgezim Tuberculosis DR

Prod Ref: 10.TB*.KO

Ensayo multiespecie de doble reconocimiento para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium bovis* en suero, plasma y sangre en papel, y en leche de pequeños rumiantes. No apto para ganado bovino.

Dual recognition multispecie assay for detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in serum, plasma and blood spots on filter paper; and in small ruminant milk samples. Not suitable for cattle

Última revisión / Last revision: 04-2018
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 10012 RD

ATENCIÓN: "ENSAYO SIN VALOR DIAGNÓSTICO PARA ANIMALES
INCLUIDOS EN PROGRAMAS DE CONTROL EN ESPAÑA"

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divided into 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo listo para su uso Vials containing Positive Control serum, ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials containing Negative Control serum, ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa listo para su uso Vials with peroxidase conjugate, ready to use	1	30ml	2	30ml
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente de suero (DE01-01) Bottles with serum diluent (DE01-01)	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	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 TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente a *Micobacterium bovis* y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero o plasma de animales infectados. La base técnica del kit, es un novedoso ensayo inmunoenzimático (ELISA) denominado de doble reconocimiento, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de M.bovis, en este caso la proteína recombinante MPB83. Cuando se añaden las muestras de suero en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade de nuevo la proteína MP83 pero conjugada con peroxidasa. En el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, muchos de ellos serán capaces de capturar la MPB83-peroxidasa a la vez que permanecen unido a la MPB83 fijada

en los pocillos. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa.

Este ensayo de alta sensibilidad está especialmente recomendado para la detección temprana de anticuerpos específicos de tuberculosis al estar favorecida la detección de IgM. También estaría indicado para la certificación de granjas negativas y la confirmación de animales negativos antes de su introducción en la granja.

IMPORTANTE: No es apto para ganado bovino. Se puede utilizar para ganado porcino, aunque INGENASA dispone de un ensayo específico, tanto para cerdo como jabalí, que es el recomendado.

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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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, 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 (a 4°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 de suero:**
Se presentan listos para su uso. No necesita dilución alguna.
- ❖ **Sueros Control Positivo, Negativo:**
Se presentan listos para su uso. Añadir 100µl a cada pocillo.
- ❖ **Preparación del conjugado:**
Se presenta listo para su uso. Añadir 100 µl a cada pocillo

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

- **Sueros::**
Realizar una dilución 1/25 en el diluyente de suero proporcionado (Por ejemplo 8 µl de suero + 192 µl de diluyente de suero, DE01-01).
IMPORTANTE: En el caso de sueros porcinos (cerdo, jabalí) realizar una dilución 1/250
- **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
- **Muestras de sangre seca en papel:**
Ver anexo.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras:**
 - Añadir 100 µl de cada muestra preparada según instrucciones anteriores.
 - Añadir 100 µl de suero control positivo a dos pocillos y 100 µl de suero control negativo a otros dos pocillos.
 - Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable valorar las muestras también por duplicado
 - Tapar la placa e incubar durante **1 hora a temperatura ambiente (22- 25°C)**.
3. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar de nuevo **1 hora a temperatura ambiente (22-25°C)**.
5. Lavar 6 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente (22°C-25°C). (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. ATENCION: 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 minutos 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 obtenidos en los dos pocillos para control positivo y control negativo.

1. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

DO del Control Positivo > 1,2

DO del Control Negativo < 0,25

2. CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

Punto de Corte negativo= DO del suero control negativo + 0.3

Punto de Corte positivo = DO del suero control negativo + 0.35

3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** cuando su DO a 450 nm sea superior al punto de corte positivo.

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** cuando su DO a 450 nm sea igual o inferior al punto de corte negativo.

Las muestras con DO comprendidas entre ambos puntos de corte se considerarán **DUDOSAS**.

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed to detect antibodies specific of *Micobacterium bovis*, being able to detect very low titers of antibodies in serum of infected animals.

INGEZIM TB DR kit is based on a novel immunoenzymatic assay called double recognition ELISA which is described below:

Plates are coated with MPB83 protein of *M.bovis*. After adding the sample to the well, if it contains specific antibodies, they will bind to the antigen coating the plate. After a washing step to remove unbound material, peroxidase conjugated MPB83 protein is added. In case of a positive sample, antibodies are capable of binding the MPB83-HRPO while still attached to the MPB83 protein coating the plate

Presence or absence of labelled MPB83 will be detected by addition of substrate (TMB) which, in presence of peroxidase, will develop a colorimetric reaction. This is a very sensitive assay recommended for early detection of antibodies specific of TB since IgM detection is favoured. The assay is also useful for negative herd certifications and to test new animals before be introduced in the herd.

IMPORTANT: Not suitable for cattle. It can be used for pigs, although INGENASA has a specific test for both pork and wild boar, which is the recommended.

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. For each utilisation of the Kit, control positive, negative and CUT OFF 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 handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored at +4°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:

- 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. Once prepared, this solution remains stable at +4°C.

- **Serum diluent:** It is ready to use

- **Positive and Negative controls:** Controls are ready to use

- **Preparation of the conjugate:** Conjugate is ready to use

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

- **Serum samples**

Serum samples must be tested at 1/25 dilution in diluent DE01-01 (i.e.: 8 µl of serum + 192 µl of serum diluent DE01-01).

IMPORTANT: Pig and wild boar serum samples must be tested at 1/250 dilution in diluent DE01-01.

- **Milk (individual and tank)**

Milk samples must be tested undiluted (100 µl/well). Fresh, refrigerated or previously frozen milk may be tested. To eliminate interference of lipids, milk must be partially skimmed by either centrifugation (15 min at 2000xg) or maintaining overnight at 4°C till the formation of a lipid layer on the surface can be detected. Then, sample should be collected under the layer of lipids to be used in the assay. To obtain whey samples, freeze/thaw the milk sample.

- **Blood spot on filter samples**

See annexe

VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C).
2. Add 100 µl of positive control to two wells of the plate, 100 µl of the negative control to other 2 wells and 100 µl of each sample prepared according to previous instructions. Seal the plate and incubate for **1 hour at room temperature** (22-25°C).
3. Wash 6 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of ready to use conjugate to each well. Seal the plate and incubate for **1 hour at room temperature** (18-25° C).
5. Wash 6 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution to each well. Keep the plate at room temperature for **10 minutes**. In order to speed up this process, it is advisable to use a multichannel pipette. Add 100 µl of stop solution to each well. We recommend adding this reagent following the same order as the substrate was added
7. Read the OD of each well at 450 nm.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Determine the mean absorbance of controls and samples, in case of assayed the last ones in duplicate.

1. VALIDATION OF THE RESULTS

OD of Positive Control > 1.2

OD of Negative Control < 0.25

2. CUT OFF CALCULATION

Positive Cut Off = OD of negative control +0.35

Negative Cut off = OD of negative control + 0.30

3. RESULTS INTERPRETATION

Samples will be considered **POSITIVE**, if the OD value at 450nm is higher than the positive cut off.

Samples will be considered **NEGATIVE** if the OD value at 450nm is equal or lower than the negative cut off.

Sample will be considered **DOUBTFUL** if the OD value at 450 nm is within the range positive and negative cut off

ANEXO / ANNEXE

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SANGRE EN PAPEL / BLOOD SAMPLE
ON FILTER PAPER EXTRACTION

1.

Usar un sacabocados para obtener un disco de unos 6 mm de diámetro

Use a punch to obtain a disc about 6 mm in diameter



2.

Depositar el disco en una placa vacía de ELISA o en un tubo eppendorf y añadir 250 µl del diluyente proporcionado en el kit.

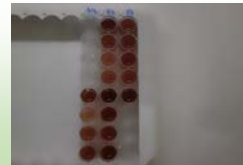
Place the disc in an empty ELISA plate or in an eppendorf tube and add 250 µl of the diluent provided in the kit



3.

Incubar 1 hora a 37°C o toda la noche (16-18 h) a 4°C sin agitación.

Incubate 1 hour at 37°C or overnight (16-18 h) at 4°C without shaking



4.

Usar la extracción a la dilución 1/2, añadiendo en primer lugar 50 µl de diluyente y en segundo lugar 50 µl de la extracción sobre la placa antigenada proporcionada en el kit

Use the extraction to the dilution 1/2, adding first 50 µl of diluent and secondly 50 µl of the extraction on the coated plate provided in the kit.

INGEZIM TUBERCULOSIS DR
10.TB*.KO

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



Distributed in by: