

INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.



INgezim TB PORCINE

Prod Ref: 11.TBP.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente al *Mycobacterium bovis* en suero, plasma y sangre en papel de cerdo y jabalí.

Enzymatic immunoassay for the detection of specific antibodies to the *Mycobacterium bovis* in swine and wild boar serum, plasma and blood spots on filter paper

Última revisión / Last review: 25-04-18

Nº registro: 3844 RD

COMPOSICION 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 | 2.5 ml | 2 | 2.5 ml |
| Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials containing Negative Control serum, ready to use | 1 | 2.5 ml | 2 | 2.5 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 (DE34-01) Bottles with serum diluent (DE34-01) | 1 | 125 ml | 2 | 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 TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno (proteína recombinante de *M.bovis*). Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados para eliminar los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de cerdo mediante un conjugado

específico marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro a 450nm.

En nuestro kit es de resaltar la utilización de antígeno obtenido por ingeniería genética, más concretamente por expresión de proteínas específicas y altamente inmunogénicas procedentes de *M.bovis*. Esto garantiza la total ausencia de infectividad en cualquiera de los componentes del kit.

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. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.

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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden 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.

V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

- **Sueros:** Realizar la dilución 1/200 en el diluyente DE34-01 suministrado. (p ej. 2 µl de suero + 398 µl de diluyente). Si el número de muestras es elevado se recomienda hacer una predilución 1/10 en una placa vacía (10µl suero + 90 µl diluyente) y a continuación hacer la 1/20 transfiriendo 5µl de la predilución a la placa de ensayo sobre la que previamente se ha añadido 95µl de diluyente
- **Muestras de sangre seca en papel:** Ver anexo

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

• Solución de lavado :

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

• Sueros Controles (+) y (-) :

Los sueros controles se presentan listos para su uso. No diluir.

• Conjugado:

El conjugado se presenta listo para su uso. No diluir.

• Diluyente: se presenta listo para su uso. No diluir.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras:**
 3. Dispensar 100 µl de control positivo a dos pocillos y 100 µl de control negativo en otros 2 pocillos. Dispensar 100 µl de cada muestra preparados según instrucciones anteriores. Tapar la placa e incubar **60min** a **temperatura ambiente** (18-25°C).
3. Lavar 3 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado listo para su uso a cada pocillo.
5. Tapar la placa e incubar **30 minutos** a **temperatura ambiente** (18-25°C).
6. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
7. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción **10 minutos** a **temperatura ambiente**. Se recomienda la utilización una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato
9. Leer a 450 nm en un lector de Elisa.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

A. Validación del ensayo:

El kit se considerará válido cuando:

El promedio de la Abs del Control (+) menos el promedio de la Abs del Control (-) sea mayor de 1.25 y además la absorbancia del control negativo sea menor de 0.20

B. Cálculo del índice de positividad (M/P):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

Para calcular el índice M/P realizar la siguiente operación

$$M/P = \frac{(\text{Abs}450 \text{ nm Muestra}) - (\text{Abs}450\text{nm C -})}{(\text{Abs } 450\text{nm C +}) - (\text{Abs } 450\text{nm C -})}$$

C. Puntos de corte

Se considera una muestra como positiva si su índice M/P es igual o superior a 0.25

Se considera una muestra como negativa si su índice M/P es inferior a 0.25

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). The technique is briefly described below:

The recombinant antigen of *Mycobacterium bovis*, is fixed on polystyrene plates. When a serum sample contains specific antibodies to *M.bovis*, they will bind to the recombinant antigen adsorbed on the plate. After a washing step to eliminate all non-fixed material, the presence of swine antibodies can be detected using a specific peroxidase conjugate. After the

addition of the substrate, a colorimetric reaction will appear which can be measured by a spectrophotometer at 450nm.

Please note that our kit uses recombinant antigen obtained by the expression of specific and highly immunogenic *M.bovis* proteins. This method warrants the total absence of infectivity in any of the components of the kit.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions for 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 substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination.
11. The stop solution is a strong acid and therefore must be handled with care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2°C and +8°C.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING PROCEDURE

The washing steps can be done using an automatic plate washer 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 instructions below:

- 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.
- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over in order to avoid the possible exchange of the contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.

V. PREPARATION OF SAMPLES

- **Serum:** Serum samples must be tested at 1/200 dilution in diluent DE34-01 (i.e. 2 µl of serum + 398 µl of diluent). If the number of samples is high, it is recommended that a 1/10 dilution in an empty plate (10 µl + 90 µl serum diluent) and then transferred 5 µl of the test plate on which has previously been 95µl of diluent added (1/20 dilution)
- **Blood spots on filter paper:** See annexe

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 of concentrated solution and 960ml of water). Once prepared this solution remains stable when stored at +4°C.
- **Control serum (+) and (-):**
Both controls are ready to use. Do not dilute
- **Conjugate:**
This reagent is ready to use. Do not dilute.
- **Serum diluent:**
This reagent is ready to use. Do not dilute.

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 another 2 wells and 100 µl of each sample, prepared according to previous instructions, in the remaining wells of the plate. Seal the plate and incubate for **60 minutes** at **room temperature** (18-25°C).
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of the ready to use conjugate to each well. Seal the plate and incubate for **30 minutes** at **room temperature** (18-25° C).
5. Wash 5 times following the procedure previously described.
5. Add 100 µl of the 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 the stop solution to each well. We recommend adding this reagent following the same order in which the substrate was added.
6. Read the OD of each well at 450 nm.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Validation of the test:

The test is considered valid when the OD of the positive control minus the OD of the negative control is higher than 1.25 and the negative control OD is lower than 0.20.

Interpretation of the results:

The S/P must be calculated as follows:

$$S/P = \frac{(\text{Sample OD}) - (\text{Neg Control OD})}{(\text{Pos Control OD}) - (\text{Neg Control OD})}$$

Samples with S/P higher or equal than 0.25 should be considered **positive**

Samples with S/P lower than 0.25 should be considered **negative**

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.

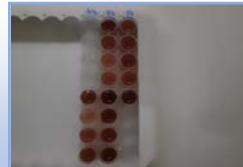
Place the disc in an empty ELISA plate or in an eppendorf tube and add 250 µl of the diluent provided in the kit



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.

Desarrollado y fabricado en España por:
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:



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2