



INGEZIM BVD DAS

Prod Ref: 12.BVD.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección de antígeno p80/p125 del virus de la Diarrea Viral Bovina en suero, sangre, plasma o tejido de oreja y cultivo celular.

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for *Bovine viral diarrhoea virus p80/p125 antigen detection in blood, serum, plasma or ear tissue samples and cell culture.*

Última revisión / Last revision: 18-06-18
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 2662 RD

Version 18-06-18: Nuevo formato de 5 placas / *New format of 5 plates*

COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	1 Placa (T) 1 Plate		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)	1	-	5	-
Viales conteniendo Control Positivo listo para usar Vials containing Positive Control sera ready to use	1 vial	2 ml	1 vial	8 ml
Viales conteniendo Control Negativo listo para usar Vials containing Negative Control sera ready to use	1 vial	2 ml	1 vial	8 ml
Viales conteniendo conjugado 1 (ACM marcado con biotina) concentrado 100x. Vials with conjugate 1 (MAB biotin conjugated)100x concentrated	1 vial	200 µl	1 vial	0,7 ml
Viales conteniendo conjugado 2 (Estreptavidina- peroxidasa) oncentrado 100x. Vials with conjugate 2 (Streptavidine-peroxidase conjugated) 100x concentrated	1 vial	200 µl	1 vial	0,7 ml
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	-	-
Frascos conteniendo diluyente (DE01-05) Bottles containing diluent (DE01-05)	-	-	2 frascos	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containig substrate (TMB) ready to use	1 frasco	15 ml	1 frasco	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stopping solution	1 frasco	60 ml	1 frasco	60 ml
Frascos conteniendo Tampón de extracción 1x (solo para tejido de oreja) Bottles containing extraction Buffer 1x (Only ear tissue)	1 frasco	60 ml	-	-
Frascos conteniendo Tampón de extracción 5x (solo para tejido de oreja) Bottles containing extraction Buffer 5x (Only ear tissue)	-	-	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 la técnica del inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (Elisa DAS). Esta técnica presenta grandes ventajas frente al resto de las técnicas tradicionalmente utilizadas: mayor índice de sensibilidad, especificidad, rapidez y fácil automatización.

A continuación se describe brevemente el fundamento de esta técnica:

Las placas se suministran tapizadas de un anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína no estructural p80/p125 del BVDV. Cuando sobre los pocillos de dicha placa, se depositan las muestras, en el caso de que exista

presencia de antígeno de BVDV, éste será capturado por los anticuerpos inmovilizados en la placa. Tras lavar para eliminar el material no capturado, se añade un conjugado específico (anticuerpo monoclonal frente a la proteína p80/p125 del BVDV marcado con biotina), capaz de reconocer al antígeno que ha quedado capturado. A continuación se añade el conjugado Streptavidina-peroxidasa y para revelar la reacción se utilizará un sustrato específico de la peroxidasa, el TMB. La presencia de color indicará por tanto la existencia de antígeno de BVDV en la muestra. La utilización de estos anticuerpos monoclonales, de gran especificidad y estabilidad, hace que los resultados de este ensayo sean fiables, objetivos y reproducibles.

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).

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 LEUCOCITOS PROCEDENTES DE SANGRE COMPLETA

a) *Materiales:*

- ✓ Sangre recogida con un anticoagulante y que no haya sufrido nunca un proceso de congelación/descongelación
- ✓ Tubo de 5 ml
- ✓ Pipeta de 5 ml
- ✓ Vortex
- ✓ Centrífuga
- ✓ Tampón de lisis (guardar entre +2°C and +8°C)
 - NH₄Cl: 16.6 gr
 - NaH CO₃ : 2.0 gr
 - Na₂ EDTA: 0.185 gr
 - H₂O destilada hasta 1 litro
 - PH 7.2 – 7.4
- ✓ Tampón bicarbonato 25 mM
 - NaHCO₃ : 0.21 gr
 - H₂O destilada: 100 ml.

b) *Método:*

- ✓ Centrifugar 2 ml de sangre completa 15 min a 1000 xg.
- ✓ Retirar el sobrenadante o plasma (este puede usarse para realizar el ensayo con plasma).
- ✓ Añadir 2 ml de tampón de lisis (ver composición). Resuspender y dejar 10-15 min a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar de nuevo 15 min a 1000 g.
- ✓ Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 400 µl de Tampón bicarbonato 25 mM.
- ✓ Usar 100 µl/pocillo de esta suspensión de leucocitos sin dilución alguna.

VI. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

• *Muestras de sangre completa, suero o plasma:*

Pueden utilizarse muestras de sangre completa con anticoagulantes, plasma o suero (por este orden de preferencia). **Antes de ensayarse se recomienda aunque no es imprescindible, un proceso de congelación / descongelación para evitar fondos y falsos positivos.** La muestra, ha de ensayarse sin diluir (100 µl de muestra/pocillo).

En caso de animales menores de 6 meses o de animales que con alguna de las muestras anteriores se hubieran obtenido resultados dudosos, el ensayo tendrá que realizarse con leucocitos preparados tal y como se indica en el punto V. Las preparaciones de leucocitos pueden ensayarse sin necesidad de ser previamente congeladas /descongeladas.

En todos los casos, las muestras con mayor sensibilidad son las preparaciones de leucocitos

• *Muestras de tejido de oreja:*

1. Transfiera la muestra de corte de oreja desde el recipiente para muestras a una placa de pocillos profundos.
2. Agregue 200µl de tampón de extracción a la placa de pocillos. Presionar ligeramente sobre la muestra con la punta de la pipeta.
3. Incube durante toda la noche (12-18 horas) entre 4°C y 22°C.

• *Muestras de cultivo celular:*

Las muestras de cultivo celular se ensayarán sin diluir. En caso de titulación, hacer diluciones seriadas en diluyente.

VII. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml más 960 ml de agua).
- **Control (+) y (-):**
No necesitan preparación alguna.
- **Diluyente:**
FORMATO 1 PLACA:
No necesita preparación alguna.
FORMATO 5 PLACAS:
Diluir 1 parte en 4 partes de agua destilada (60 ml de concentrado más 240 de agua). Una vez preparada, las soluciones permanecen estables a 4°
- **Tampón de extracción (sólo para tejido de oreja):**
FORMATO 1 PLACA:
No necesita preparación alguna.
- **FORMATO 5 PLACAS:**
Diluir 1 parte en 4 partes de agua destilada (60 ml de concentrado más 240 de agua). Una vez preparada, las soluciones permanecen estables a 4°
- **Preparación de los conjugados: A realizar inmediatamente antes de su utilización**
Realizar una dilución 1/100 en diluyente suministrado:
Para una tira de 8 pocillos diluir 10 µl de conjugado concentrado hasta 1 ml de diluyente.
Para una placa completa recomendamos diluir 110 µl de conjugado hasta 11 ml de diluyente.
Preparar únicamente el volumen de cada conjugado, estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada

VIII. PROCEDIMIENTO I (sueros, sangre y plasma)

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto los conjugados) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl / pocillo de las muestras y de los controles por duplicado. Tapar la placa e **incubar 18-24 horas a temperatura ambiente (18-25°C)**.
3. Lavar 6 veces según procedimiento descrito. **En caso de quedar restos de muestra en el pocillo, lavar las veces que sean necesarias hasta eliminar todos los restos.**
4. Añadir 100 µl del Conjugado 1 según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 60 min a 37°C**.
5. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente
6. Añadir 100 µl del conjugado 2, preparado según instrucciones previas, a cada pocillo. **Incubar 30 min a temperatura ambiente (18-25°C)**.
7. Lavar 6 veces.
8. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción **durante 5 minutos a temperatura ambiente**.
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
10. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

IX. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (procedimiento I)

A. Validación del test:

El ensayo se considerará válido siempre que se cumpla los siguientes resultados:

DO (Control Positivo) / DO (Control Negativo) sea > 10

B. Interpretación de resultados:

En el caso de haber ensayado las muestras por duplicado, deberán hallarse para cada muestra la media aritmética de las DO obtenidas.

Cut off: 10% de la DO del Control Positivo

- Cuando el valor de DO sea superior a la DO del Cut off, más el 15% (Cut off + 15%) la muestra se considerara positiva para antígeno de BVDV.
- Cuando el valor de DO sea inferior a la DO del Cut off, menos el 15% (Cut off - 15%) la muestra se considerará negativa para antígeno de BVDV.
- Para valores de DO comprendidos entre ± 15% del valor del Cut off las muestras serán consideradas dudosas. En estos casos deberá repetirse el ensayo con leucocitos preparados y de repetirse el resultado, recogerse una nueva muestra del individuo transcurridos unas semanas.

C. Ejemplo:

Abs Control (+) = 2.05

Abs Control (-) = 0.070

Cut off= 10% de 2.05 = 0.205

Rango de dudosos= 0.205 ± 15%= 0.174 a 0.235

Valores de Abs superiores a 0,235 se consideran positivos y valores inferiores a 0.174 negativos. Cualquier resultado positivo se considerará indicativo de un animal persistentemente virémico. Sin embargo, se necesitarán dos resultados positivos (con dos muestras tomadas con un intervalo de 3-4 semanas) para confirmar ésta infección persistente. Si además, el animal es negativo para anticuerpos el diagnóstico de IPI es definitivo.

NOTA: Un único resultado positivo puede obtenerse de un animal infectado por BVDV en su fase aguda (2 semanas siguientes a la infección) y potencialmente de un animal vacunado recientemente con vacunas vivas de BVD

X. PROCEDIMIENTO II (tejido de oreja y cultivo celular)

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto los conjugados) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl/pocillo de las muestras previamente extraídas (en caos de tejido) o 100 µl/pocillo de sobrenadante de cultivo celular, y de los controles por duplicado. Tapar la placa. **Recomendamos incubar 2,5 horas a 37°C.** Existe, no obstante, la opción de incubación larga consistente en 12-18 horas entre +2°C y +8°C.
3. Lavar 6 veces según procedimiento descrito en el protocolo completo. **En caso de quedar restos de muestra en el pocillo, lavar las veces que sean necesarias hasta eliminar todos los restos.**
4. Añadir 100 µl del Conjugado 1 según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 60 min a 37°C.**
5. Lavar 6 veces según procedimiento descrito anteriormente
6. Añadir 100 µl del conjugado 2, preparado según instrucciones previas, a cada pocillo. **Incubar 30 min a temperatura ambiente (18-25°C).**
7. Lavar 6 veces.
8. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad. Mantener la reacción **durante 5 minutos a temperatura ambiente.**
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, siguiendo el mismo orden que se utilizó para dispensar la solución sustrato.
10. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

XI. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (procedimiento II)

A. Validación del test:

El ensayo se considerará válido siempre que se cumpla los siguientes resultados:

$$\text{DO}(\text{Control Positivo}) / \text{DO}(\text{Control Negativo}) > 10$$

B. Interpretación de resultados:

En el caso de haber ensayado las muestras por duplicado, deberán hallarse para cada muestra la media aritmética de las DO obtenidas.

Cut off: 10% de la DO del Control Positivo

C. Ejemplo:

$$\text{Abs Control (+)} = 1.65$$

$$\text{Abs Control (-)} = 0.070$$

$$\text{Cut off} = 10\% \text{ de } 1.65 = 0.165$$

Valores de Abs superiores o iguales a 0,165 se consideran positivos y valores inferiores a 0.165 negativos.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a double antibody sandwich enzymatic immunoassay (DAS or capture Elisa). We make a brief description of the technique below:

The plate is coated with a monoclonal antibody to the non-structural protein p80/p125 of the BVD virus. In this way when a sample is added into the wells, if it contains antigen, the antibodies will catch it. After incubation and washing, a

biotin-conjugated monoclonal antibody to p80/p125 is added.

If there is antigen captured into the well, the biotin conjugate, will bind to it. After incubation and washing you add a second conjugate (Streptavidin peroxidase conjugated) and the peroxidase action will be detected after adding the adequate substrate.

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 an 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 handle with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +8°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. LEUKOCYTE PREPARATION TECHNIQUE FROM WHOLE BLOOD:

a) *Materials:*

- ✓ Heparin or EDTA blood.
- ✓ 5 ml tube
- ✓ 5 ml pipette.
- ✓ Vortex
- ✓ Centrifuge
- ✓ Lysis buffer (store between +2°C and +8°C)
 - NH₄Cl : 16.6 g
 - NaH CO₃ : 2 g
 - Na₂ EDTA: 0.185 g
 - Distilled H₂O untill 1 L
 - pH 7,2-7,4
- ✓ Bicarbonate buffer 25 mM
 - NaHCO₃ : 0,21 g
 - Distilled H₂O untill 100 ml.

b) *Method*

- ✓ Centrifuge 2 ml of blood at 1000x g for 15 minutes
- ✓ Remove the supernatant (plasma) and store it frozen if needed
- ✓ Add 2 ml of lysis buffer to the cell pellet. Mix thoroughly by vortexing and leave at room temperature for 15 minutes.
- ✓ Centrifuge at 1000x g for 15 minutes.
- ✓ Discard the supernatant and add 400 µl of bicarbonate buffer to the pellet. Vortex thoroughly.
- ✓ Use 100 µl/well for testing as described in test protocol.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

• *Plasma, serum, whole blood samples:*

Whole blood (with heparin or EDTA), plasma or serum can be used (in this order of preference). **Before use, we recommend, although it is not mandatory to freeze and thaw the samples once to avoid false positives results.**

Samples are used without dilution (100 µl/well). Samples doubtful or from animals younger than 6 months should be tested using a leukocyte preparation (see section V). Leukocytes can be tested without freezing and thawing process.

The highest sensitivity is reached by testing leukocytes samples.

• *Ear tissue samples:*

1. Transfer the ear sample to a plate of deep wells.
2. Add 200µl of Extraction Buffer to the wells. Pressing lightly the sample with the pipette tip.
3. Incubate over night (12-18 hours) in the range of 4°C and 22°C.

• *Cell culture:*

Cell cultura samples will be assayed without dilution. In case of titration, dilute in sample diluent.

VII. PREPARATION OF REAGENTS

• *Washing solution:*

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml concentrated solution with 960 ml of distilled water). When ready this solution remains stable at +4°C

• *Controls:*

Controls are at working dilution, ready to use.

• *Diluent:*

1 PLATE FORMAT

The diluent is at working dilution, ready to use.

5 PLATES FORMAT

5x concentrated. Before using it, a 1/5 dilution must be done with distilled or desionized water (1 volume of concentrated supplied diluent with 4 volumes of distilled water)

• *Extraction buffer:*

1 PLATE FORMAT

The extraction buffer is at working dilution, ready to use.

5 PLATES FORMAT

5x concentrated. Before using it, a 1/5 dilution must be done with distilled or desionized water (1 volume of concentrated supplied diluent with 4 volumes of distilled water)

• *Preparation of the conjugates: to make immediately before use.*

Dilute the needed quantity of conjugates provided in the kit 1/100 into diluent (e.g. 10 µl of conjugate into 1 ml of diluent is enough quantity for one strip of 8 wells). For a plate add 110 µl of concentrated to 11 ml 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

VIII. TEST PROCEDURE I (serum, plasma and whole blood)

- All reagents (except conjugates) must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 100 µl/well of positive control, negative control and samples to test. We recommend the use of duplicate wells for both, samples and controls. Seal the plate and incubate **for 18 h at room temperature (18-25°C)**.
- Wash six times as specified in point IV.
Verify the cleanliness of the wells (no residual traces of blood) and if necessary, proceed with additional washes as advised in point V
- Add 100 µl/well of biotin conjugate or conjugate 1 (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**
- Wash 6 times following the described procedure.
- Add 100 µl/well of peroxidase conjugate or conjugate 2 (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at room temperature (18-25°C)**.
- Wash 6 times following the described procedure.
- Add 100 µl/well of TMB substrate. **Keep the plate for 5 minutes at room temperature.**
- Add 100 µl/well of stop solution.
- Read with spectrophotometer at 450nm within 5 min after the addition of stop solution.

IX. READING AND RESULT INTERPRETATION. (test procedure I)

A. Validation of the test

The test can be considered valid when:

- ⇒ The ratio, OD of the Positive control / OD of Negative control is higher than 10

B. Results interpretation:

When you are running duplicates, OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

CUT OFF = OD of Positive Control x 0.1

- Samples with an OD higher than cut off value plus 15% must be considered as **POSITIVE** to BVDV antigen
- Samples with OD lower than cut off value minus 15% must be considered as **NEGATIVE** to BVDV antigen
- Samples with OD values between both values are considered as **DOUBTFUL**. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this sample.

C. Example:

OD Control (+) = 2.05

OD Control (-) = 0.07

Cut off = $2.05 \times 0.1 = 0.205$

- Samples Positives (OD higher than)
 $0.205 + (0.15 \times 0.205) = 0.205 + 0.030 = 0.235$
- Samples Negative (OD lower than)
 $0.205 - (0.15 \times 0.205) = 0.205 - 0.030 = 0.174$
- Samples doubtful
OD between 0.174 and 0.235

Any positive sample should be considered as sample from a persistently infected animal. However, you need two positive results of paired samples of the animal (interval of 3-4 weeks between them) in order to confirm the diagnosis. In addition, if the animal is antibody-negative to BVDV you must definitively consider it as PI.

X. TEST PROCEDURE II (ear tissue and cell culture)

1. All reagents (except conjugates) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl/well of positive control, negative control and samples to test. We recommend the use of duplicate wells for both, samples and controls. Seal the plate. We recommended to incubate **for 2,5 h at 37°C**. Nevertheless, there is the possibility of incubate over night between +2°C and +8°C).
3. Wash six times as specified in point IV.
4. **Verify the cleanliness of the wells (no residual traces of blood) and if necessary, proceed with additional washes as advised in point V**
5. Add 100 µl/well of biotin conjugate or conjugate 1 (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
6. Wash 6 times following the described procedure.
7. Add 100 ul/well of peroxidase conjugate or conjugate 2 (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at room temperature (18-25°C)**.
8. Wash 6 times following the described procedure.
9. Add 100 µl/well of TMB substrate. **Keep the plate for 5 minutes at room temperature**.
10. Add 100 µl/well of stop solution.
11. Read with spectrophotometer at 450nm within 5 min after the addition of stop solution.

XI. READING AND RESULT INTERPRETATION. (test procedure II)

A. Validation of the test

The test can be considered valid when:

- ⇒ The ratio, OD of the Positive control / OD of Negative control is higher than 10

B. Results interpretation:

When you are running duplicates, OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

CUT OFF = 10% of OD of Positive Control

- Samples with an OD higher than or equal to cut off value must be considered **POSITIVE** to BVDV antigen
- Samples with OD lower than cut off value must be considered as **NEGATIVE** to BVDV antigen

C. Example:

OD Control (+) = 1.65

OD Control (-) = 0.07

Cut off = $1,65 \times 0.1 = 0.165$

- Samples Positives: OD higher than or equal to 0.165
- Samples Negative: OD lower than 0.165

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:

