

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM BESNOITIA

Prod Ref: 12.BES.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a *Besnoitia besnoiti* en suero de ganado bovino.

Indirect immunoenzymatic assay for detection of specific antibodies to *Besnoitia besnoiti* bovine serum.

Última revisión / Last Revision: 15/10/2018

Registrado en España con nº

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Uni.	vol.	Uni.	vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras, tapizadas con antígeno de Besnoitia. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated with Besnoitia.	2	-	5	-
Viales conteniendo suero Control Positivo listo para su uso Vials with Positive serum Control ready to use.	1	2,5 ml	1	2,5 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo listo para su uso Vials with Negative serum Control ready to use.	1	2,5 ml	1	2,5 ml
Viales conteniendo Conjugado con peroxidasa listo para su uso. Vials with ready to use peroxidase conjugate.	1	15 ml	2	15 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE19-01). Bottles with diluent (DE19-01).	1	60 ml	2	60 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with 25x concentrated washing solution.	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato TMB a la dilución de uso. Bottles with TMB substrate ready to use.	1	30 ml	1	30 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles with stop solution.	1	65 ml	1	65 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

Este inmunoensayo enzimático (ELISA) se ha desarrollado para detectar la presencia de anticuerpos específicos de Besnoitia besnoiti en suero bovino. Las muestras de suero se diluyen 1/100 y se incuban durante 60 minutos en los pocillos sensibilizados con antígeno específico de Besnoitia. Tras un primer lavado, se añade un conjugado anti-IgG bovina y se incuba 60 minutos más. Después de lavar, se añade el sustrato, el cual en caso de reacción positiva

desarrollará un color azul. Tras 10 minutos la reacción se frena pasando el color de azul a amarillo y este se cuantifica en un lector de ELISA. El color en los pocillos indica la presencia de anticuerpos específicos de Besnoitia. Cuanto más alta sea la concentración de anticuerpos en la muestra de suero más intenso será el color en el pocillo y por tanto mayor la densidad óptica (DO).

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. 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. **¡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.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (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.
- 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:

Diluir las muestras de suero 1/100 en el diluyente DE19-01. Se recomienda realizar esta dilución en dos pasos del siguiente modo: diluir inicialmente en una placa vacía 10 µl de suero en 190 µl de diluyente y a continuación transferir 10 µl de esta dilución a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 40 µl de diluyente DE19.

VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit, con 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrado más 960 ml de agua destilada).
- **Preparación de diluyente:**
Está listo para uso, NO DILUIR
- **Sueros controles:**
Están listos para uso, NO DILUIR.
- **Conjugado:**
Está listo para uso, NO DILUIR

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes a temperatura ambiente.
2. Dispensar 50 µl de las diluciones de sueros a testar (preparado según instrucciones anteriores). Añadir a continuación 50 µl de los controles positivo y negativo listos para usar. Recomendamos la realización de los controles por duplicado. Tapar la placa e incubar **60 minutos a 37°C ± 1°C**.
3. Lavar 3 veces con solución de lavado según el procedimiento descrito.
4. Añadir 50 µl del Conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar **60 min a 37°C ± 1°C**.
5. Lavar 4 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 50 µl de sustrato a cada pocillo, agitar suavemente y mantener la reacción durante **10 minutos** a temperatura ambiente (23°C ± 2°C) y en oscuridad.
7. Añadir 50 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispensó el sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 5 minutos.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Cálculo del Índice de Positividad (IRPC):

Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas. Para calcular el índice IRPC realizar la siguiente operación:

$$\text{IRPC} = \frac{\text{Abs(Muestra)} - \text{Abs(Control -)}}{\text{Abs(Control +)} - \text{Abs(Control -)}} \times 100$$

B. Validación del test:

El test se considerará válido cuando:

1. Abs control positivo > 0,8
2. Abs del control negativo < 0.3

C. Interpretación de resultados:

- IRPC de la muestra ≥ 20 se considera positivo.
- IRPC de la muestra < 17 se considera negativo.
- IRPC de la muestra entre ambos valores se considera dudoso. Se recomienda recoger una segunda muestra en 2 semanas y retestar.

I. TECHNICAL BASIS

This enzymatic immunoassay (ELISA) has been developed for the detection of specific antibodies to *Besnoitia besnoiti* in bovine serum. Sera samples must be diluted at 1/100 and incubated in the wells coated with *Besnoitia* antigen for 60 minutes. After the first washing step, the anti-bovine IgG conjugate is added and incubated for 60 minutes. After a second

wash, the substrate is dispensed and after 10 minutes the reaction is stopped. The colour development is read with an ELISA reader. The colour indicates the presence of specific antibodies to *Besnoitia besnoiti*. The more concentration of antibodies it has, the more intensity of colour it develops, and therefore, the optical density (OD) will be higher.

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 and negative serum 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. **IMPORTANT!** Substrate must be handled with care, it is very sensitive to light and contamination. Remove the volume to use from the bottle and never put the remaining volume back into it.

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 microplate 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 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 it 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 on an absorbent filter paper.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Dilute serum samples 1/100 in diluent DE19-01. This dilution is recommended in two steps as follows: initially dilute 10 µl of serum in 190 µl of diluent and then transfer 10 µl of this dilution to one well of the ELISA plate contain 40 µl of diluent DE19.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled water or deionized water (40 ml of concentrate solution and 960 ml of water). This solution remains stable between +2°C and +8°C.
- **Preparation of diluent 1x:**
Is ready to use. Do not dilute
- **Control sera:**
Control sera are ready to use. Do not dilute
- **Preparation of the conjugate:**
Is ready to use. Do not dilute

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 50 µl of samples diluted as it is specified in the previous instructions. Add 50 µl of Positive and Negative control serum ready to use to their respective wells. We recommend to run controls in duplicate wells. Cover and incubate the plate for **60 minutes at 37°C ± 1°C**.
3. Wash 3 times with washing solution following the described procedure.
4. Add 50 µl of Conjugate to each well. Cover and incubate the plate for **60 minutes at 37°C ± 1°C**.
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 50 µl of substrate solution, to each well. Shake softly and keep the plate for **10 min at room temperature (23°C ± 2°C)** in a dark place.
7. Add 50 µl of stop solution to each well in the same order as the substrate was dispensed.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm in the following 5 minutes.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

B. Positivity Index Calculation (IRPC):

If you run samples in duplicate, OD values will be calculated for each sample as the arithmetic mean of both values.

To obtain IRPC of the sample:

$$\text{IRPC} = \frac{\text{Abs(Sample)} - \text{Abs(Control -)}}{\text{Abs(Control +)} - \text{Abs(Control -)}} \times 100$$

C. Validation of the test:

The test could be considered valid if:

1. OD_{450nm} Positive control > 0,8
2. OD_{450nm} Negative control < 0.3

D. Interpretation of the results:

- Sample IRPC ≥ 20 will be considered as positive.
- Sample S/P < 17 will be considered as negative.
- Sample with values between both IRPC will be considered doubtful. A second serum sample could be collected 2 weeks later and retested.

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)
Tlf: +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