



INGEZIM ROTA BOVINO

Prod Ref: 12.RT.K1

Ensayo inmunoenzimático, para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos de *rotavirus tipo A* en muestras de suero bovino.

Enzymatic immunoassay for detection and/or quantification of antibodies against *rotavirus type A* in bovine sera samples.

Última revisión / Last revision: 27-05-13

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates	
	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-
Viales conteniendo suero Control Positivo Vials containing Positive Control sera	1 vial	150 µl
Viales conteniendo suero Control Negativo Vials containing Negative Control sera	1 vial	150 µl
Viales conteniendo conjugado (AcM marcado con peroxidasa) concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated (MAb peroxidase conjugated)	1 vial	300 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1 frasco	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-05) Bottles containing diluent (DE01-05)	1 frasco	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1 frasco	30 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing stop solution	1 frasco	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 TÉCNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto (**ELISA Indirecto**). El fundamento de la técnica, se detalla brevemente a continuación. Se tapiza la superficie de una placa con antígeno viral. Sobre esta superficie tapizada de antígeno, se dispensan los sueros a testar. En el caso de existir anticuerpos específicos frente al antígeno de la placa, éstos se unirán mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Tras lavar la placa eliminando el material no adherido, revelaremos la presencia de anticuerpos capturados, mediante la utilización de un conjugado específico para

inmunoglobulinas bovinas añadiendo posteriormente el sustrato del enzima que en presencia de esta dará lugar a una reacción colorimétrica. La aparición de color indicará la presencia de anticuerpos en el suero analizado.

En el caso de interesar el título de anticuerpos presentes en el suero, deberán hacerse diferentes diluciones del mismo y llevar a cabo el análisis con cada una de estas diluciones. El título vendrá dado por la mayor dilución en la que puedan detectarse la presencia de anticuerpos de manera significativa.

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 CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

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 LAS MUESTRAS:

- Para la TITULACIÓN de los sueros, se recomienda realizar el número de diluciones que se consideren en factor 2 a partir de la 1/100 (recomendamos un mínimo de 8 diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, etc.).
- Cuando se quiera realizar un SCREENING, será suficiente con realizar el ensayo a dos pocillos por suero, utilizando para ello la dilución 1/100 de la muestra.

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 concentrada más 960 ml de agua).

- **Diluyente:**

Diluir un volumen de concentrado con 4 volúmenes de H₂O destilada. Una vez preparada la solución 1x es estable a 4°C.

- **Control (+) y (-):**

Tratar los sueros controles como las muestras, haciendo una dilución 1/100 (5µl en 0,5 ml de diluyente). Para titular, hacer diluciones de factor 2. Distribuir en alícuotas y congelar en caso de no utilizarse en menos de una semana.

- **Preparación del conjugado: A realizar inmediatamente antes de su utilización.**

Realizar una dilución 1/100 en diluyente 1x preparado según instrucciones:

- Para una tira de 8 pocillos recomendamos 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.

Homogenizar bien la solución antes de su utilización.

ATENCIÓN: Preparar inmediatamente antes de su utilización. Preparar únicamente la cantidad estrictamente necesaria, ya que el volumen sobrante debe ser desechado.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones (realizadas según procedimiento descrito anteriormente) de control positivo en los 8 pocillos de la primera columna de la placa y 100µl de cada dilución del control negativo en los 8 pocillos de la segunda columna.

Dispensar 100µl de cada dilución de los sueros problema en el resto de los pocillos de la placa.

Si se realiza el ensayo en forma de screening, será suficiente con utilizar dos pocillos para el control positivo, 2 para el negativo y dos por cada muestra a testar a la misma dilución (1/100). Tapar la placa e incubar **1 hora a 37°C**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento indicado anteriormente.
4. Añadir 100 µl de Conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa en incubar **30 minutos a 37°C**.
5. Lavar 5 veces según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **10 minutos a temperatura ambiente** en oscuridad. Para la realización de este proceso, resulta conveniente la utilización de una pipeta multicanal.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Es recomendable añadirla en el mismo sentido en que se dispensó el sustrato.
8. Leer a 450 nm de longitud de onda en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

A. Validación del test:

El kit se considerará válido cuando:

- DO Control Positivo a la 1/100 > 0.8
- Do Control Negativo a la 1/100 < 0.2

B. Cálculo del cut off:

Punto de Corte +/- = Abs₄₅₀ Control Negativo +0.4

C. Interpretación de resultados

• Para screening:

El valor de absorbancia de cada muestra será la media aritmética resultante de los dos pocillos ensayados para cada suero.

- Todo suero que presente un valor de Absorbancia superior al Punto de Corte se considerará Positivo
- Todo suero que presente un valor de Absorbancia inferior al Punto de Corte se considerará Negativo

• Para titulación:

El título de la muestra será la última dilución cuyo valor de absorbancia se encuentre por encima del punto de corte.

I. TECHNICAL BASIS

The kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (**Indirect ELISA**). We make a brief description of the technique below:

We fix the antigen on a solid support (Polystyrene plate). When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen absorbed on plate. After washing to eliminate all non-fixed material from the sera sample, we can detect presence of bovine immunoglobulins using a

specific Monoclonal antibody conjugated with peroxidase. After addition of the substrate, a colorimetric reaction will appear which could be measured by a spectrophotometer.

In this way, the presence of colour means the presence of antibodies against the virus in the bovine sera and the absence of colour, the absence of specific antibodies.

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 kit's reagents.
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 plates 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:

The sera samples need to be at 1/100 dilution in diluent to be tested (5 µl of serum in 0.5 ml of diluent). For titration, we recommend to assay 8 two fold

dilutions for each sample (from 1/100 to 1/12800). For your facilities this step could be done directly on the plate

VI. PREPARATION OF REAGENTS

• **Washing solution:**

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

• **Preparation of control sera (+) and (-):**

Make dilution 1/100 (as sample sera) in diluent (5 µl of serum in 0,5 ml of diluent). If you need to do a partial use of the kit, we recommend to make aliquots of the control sera and store them at -20°C till use.

• **Preparation of Diluent:**

Dilute one volume of the concentrated diluent provided in the kit with 4 volumes of distilled or deionized water. Store this solution at 4°C.

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

Dilute 1/100 with diluent 1x prepared as it's described at point "Preparation of diluent":

- The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of conjugate in 11 ml of diluent.
- The necessary and sufficient quantity of conjugate for an 8 wells strip is 10 µl of conjugate in 1 ml of diluent.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µl of each dilution of positive control serum, diluted as it's specified in the previous instructions, to each well of the first row of the plate and 100 µl of each dilution of the negative control serum to the wells of the second row of the plate. Add 100µl of each dilution of sera samples to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate (use one row per serum). Seal the plate and incubate for **60 min at 37°C**.

This assay can be used as **screening assay**. In that case, controls, as well as samples sera must be tested in two wells at a single dilution of 1/100.
3. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate **for 30 min at 37°C**.
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate. Keep the plate for **10 min at room temperature** in darkness.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the absorbance of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

A. Validation criteria:

The assay will be valid only when:

- OD of positive control is higher than 0.8
- OD of negative control is lower than 0.2

B. Cut off calculation:

Cut off = OD of negative control plus 0,4

C. Results Interpretation:

• **For screening proposes:**

The OD value must be the average between the OD values obtained for each sample.

- All samples with an OD value higher than Cut off must be considered positive.
- All samples with an OD value lower than Cut off, must be considered negative.

• **For titration purposes:**

The titre of each sample, will be the highest dilution which develops a positive result (OD value higher that Cut off value)

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:

Empty box for distributor information.