



INGEZIM ROTAVIRUS PORCINO

Prod Ref: 11.RTP.K1

Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos específicos de *rotavirus tipo A* en suero porcino.

Enzymatic immunoassay for detection and/or quantification of antibodies against *rotavirus type A* in porcine serum

Última revisión / Last revision: 24-11-17

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each	2	-
Viales de suero Control Positivo Vials positive control serum	1	150 µl
Viales de suero Control Negativo Vials negative control serum	1	150 µl
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	300 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente 5x concentrado (DE01-05) Bottles with diluent 5x concentrated (DE01-05)	1	100 ml
Frascos de Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	30 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	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.
Micropipets 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 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 porcinas añadiendo posteriormente el sustrato del enzima que en presencia de ésta 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.

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 un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. El sustrato es un reactivo tremendamente sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Para su utilización es recomendable retirar el volumen necesario por decantación, o mediante pipeta estéril, en otro recipiente y nunca devolver el volumen sobrante al frasco.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. CONSERVACION DEL KIT

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 utilizations.

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

• **Titulación:**

Se recomienda realizar el número de diluciones que se consideren en factor 2 a partir de la 1/200 (recomendamos un mínimo de 8 diluciones 1/200, 1/400, 1/800, etc.).

• **Screening:**

Será suficiente con realizar la dilución 1/200 de la muestra (5 µl de suero en 1 ml de diluyente).

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada.
- **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 1/200 (5µl en 1 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.
Homogeneizar bien la solución antes de su utilización.
Preparar únicamente el volumen de conjugado, estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.

VII. PROCEDIMIENTO:

1. Antes de comenzar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras y controles**
SCREENING:
Añadir 100µl de controles y de muestras diluidos 1/200. Utilizar dos pocillos para el control positivo, 2 para el negativo y dos por cada muestra a testar.
TITULACIÓN:
Dispensar 100 µl de cada una de las diluciones (realizadas según procedimiento descrito anteriormente) de las muestras utilizando una columna por muestra. Dispensar 100µl de control positivo y 100µl de control negativo a dilución 1/200. Utilizar 2 pocillos para cada uno de los controles
Tapar la placa e incubar 30 min. a 37°C.
3. Lavar 5 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 6 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 la solución sustrato.
8. Leer a 450 nm en un lector de ELISA en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

A) VALIDACION DEL TEST

El kit se considerará válido cuando:

DO Control Positivo a la 1/200 > 0.7
DO Control Negativo a la 1/200 < 0.4

B) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS :

Punto de Corte +/- = 0.4

Todo suero que presente un valor de Absorbancia superior al Punto de Corte se considerará Positivo.

En caso de realizar el ensayo de **SCREENING**, el valor de absorbancia de cada muestra será la media aritmética resultante de los dos pocillos ensayados para cada suero.

En el caso de realizar el ensayo de **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

the presence of porcine immunoglobulins using an specific peroxidase conjugate. 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 porcine sera and the absence of colour, the absence of specific antibodies.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use instructions 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. Use a new tip for each serum sample.
8. For each utilisation of the kit, positive and negative control serum must be tested in a systematic way.
9. Substrate is very sensitive to light and contamination so never pipette directly from the substrate storage bottle. The necessary amounts for each assay must be always pour into a separate container.
10. Stop solution is a strong acid. Handle with care

III. STORAGE OF COMPONENTS

Plates and reagents 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

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:

- **Titration:**

We recommend to assay 8 two fold dilutions for each sample (from 1/200 to 1/25600). For your facilities this step could be done directly on the plate.

- **Screening:**

Sera samples must be used at 1/200 dilution in diluent to be tested (5 µl of serum in 1 ml of diluent).

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionised water. When ready this solution remains stable stored at 4°C.

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

Make a dilution 1/200 (as sample sera) in diluent (5 µl of serum in 1 ml of diluent). If you need to do a partial use of the kit. We recommend to make aliquots of the control sera after the reconstitution and to 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 deionised water. Store this solution at 4°C.

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

Dilute 1/100 with serum diluent 1x prepared as it's said in 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. **SCREENING:**

Add 100µl of controls and samples diluted 1/200. Use two wells for positive control, two for negative control and two for each sample to be tested.

TITRATION:

Add 100 µl of each dilution of the samples (diluted as it is described in the previous instructions) using one row per sample. Add 100µl of positive control and 100µl of negative control at dilution 1/200. Use two wells for positive control and two for negative control.

Seal the plate and incubate for **30 min at 37°C**.
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 4 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 absorbances of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

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

A) Validation of the plate:

For validation, OD values of the control sera must fulfil these requirements:

- OD of Positive control at 1/200 > 0.7
- OD of Negative control at 1/200 < 0.4

B) Results Interpretation:

The Cut Off +/- = 0.4

Samples with OD values higher than the cut off must be considered positive.

In case of **SCREENING**, the OD value of each sample will be the average between the OD values obtained in the two wells used for this serum.

In case of **TITRATION**, the titre of the sample will be the last dilution at which the OD value is higher than the cut off.

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:

