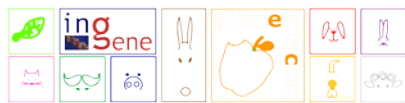


INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.



INGEZIM RHDV DAS

Prod Ref: 17.RHD.K2

Ensayo inmunoenzimático para la detección del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo en muestras biológicas.

Enzymatic immunoassay for detection of rabbit haemorrhagic disease virus in biological samples.

Última revisión / Last revision: 26/11/10

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 3055 RD

COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	1 Placa (T) 1 Plate	
	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras, tapizadas 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated	1	-
Viales conteniendo Control Positivo Vials containing Positive Control sera	1	75 µl
Viales conteniendo Control Negativo Vials containing Negative Control sera	1	75 µl
Viales conteniendo conjugado concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated	1	250 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01) Bottles containing diluent (DE01-01)	2	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB). Bottles containing substrate (TMB)	1	15 ml
Frascos conteniendo solución de frenado (Ácido Sulfúrico). Bottles containing stop solution (Sulfuric Acid)	1	15 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 de doble anticuerpo (**ELISA- DAS**). Esta técnica presenta grandes ventajas frente al resto de las técnicas clásicas utilizadas para la detección del virus: mayor índice de sensibilidad, especificidad, rapidez y fácil automatización.

Brevemente, esa técnica consiste en tapizar los pocillos de una placa con un anticuerpo policlonal específico frente a RHDV. Sobre esta placa tapizada se añaden las muestras a ensayar, incubándose durante 1h. Durante la incubación, el virus presente en las muestras será capturado por el anticuerpo específico

fijado a la placa. Transcurrido este tiempo, se procederá a eliminar mediante lavados el material no unido al policlonal. Para revelar la presencia o ausencia de virus capturado por el policlonal fijado a la placa, se añadirá otro anticuerpo frente a RHDV que se encuentra conjugado a su vez con un enzima, en este caso con peroxidasa. Tras eliminar el resto del material no unido mediante lavado de la placa, se procederá a revelar la reacción con un sustrato específico de la peroxidasa, el TMB. La presencia de color indicará por tanto la existencia de virus en la muestra.

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. Tanto el sustrato como la solución de frenado, han de ser manipulados con precaución.

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 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 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.

¡ATENCIÓN! Se están manipulando muestras que contienen agentes infecciosos, asegurarse que el material se desinfecta. Para ello se recomienda vaciar las placas sobre un recipiente que contenga sosa.

V. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Se macera 1 gr de muestra (higado de conejo) en 2 ml de diluyente, centrifugándose a continuación 10 min. a 1000 rpm. Se recoge el sobrenadante que será utilizado como muestra en el ensayo.

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 25x más 960 ml de agua destilada). Una vez diluida, la solución permanece estable entre +2°C y +8°C.
- **Preparación de controles (+) y (-):**
Realizar una dilución 1/100 del contenido de los viales de control positivo y negativo (5 µl de control hasta 0,5 ml en diluyente).
- **Preparación del conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar una solución 1/100 en diluyente (10µl de conjugado hasta 1 ml en diluyente de suero es la cantidad necesaria para 8 pocillos). Homogeneizar bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Las tiras a utilizar deben permanecer a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de su utilización.
2. Dispensar 100 µl de los controles preparados según procedimiento anterior, en el primer pocillo, 100 µl de cada muestra a testar en cada uno de los pocillos restantes. Tapar la placa e **incubar 1h a 37°C**.
3. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0.1M. Lavar 4 veces la placa según procedimiento indicado anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 1h a 25°C (temperatura ambiente)**.
5. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0.1M. Lavar según procedimiento anteriormente descrito 4 veces.
6. Añadir 100 µl/pocillo de solución sustrato. Mantener la reacción a temperatura ambiente **durante 5 minutos**.
7. Para la reacción añadiendo a cada pocillo 100 µl de solución de frenado.
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 con un colorímetro a una longitud de onda de 450 nm.

A. Validación del test:

El test se considerara válido cuando se cumpla:

DO_{450} Control (+) > 1

DO_{450} Control (-) < cut off

Interpretación de resultados:

El punto de corte (cut-off) positivo/negativo, se calcula como el 15% del valor de absorbancia del control positivo:

Cut off: $0,15 \times OD_{450}$ Control (+)

Si la muestra presenta un valor de absorbancia superior al valor del punto de corte, será considerada positiva. Si por el contrario, la muestra presenta un valor inferior al punto de corte, se considerará negativa

I. TECHNICAL BASIS

The kit is based on a **Double antibody sandwich enzymatic immunoassay**. This technique shows big advantages from the rest of the techniques used till now: more sensitivity, more specificity, faster to do and easily automatizable.

Here we describe the technical basis of the assay: a rabbit polyclonal antibody against RHDV is coated on a solid support (polystyrene plate). When a sample containing

viral antigen is added, the viral particles will be caught by the antibody, After washing to remove all material not bound to the plate, we add a peroxidase conjugated antibody specific for RHDV. In the presence of viral antigen this conjugate will bind to it. We could demonstrate the presence of this labelled antibody by adding a chromogenic substrate that in presence of the enzyme will produce a colorimetric reaction.

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 handle.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. For each utilisation of the Kit, positive control and negative must be tested in a systematic way.
10. Substrate and stop solution must by handle whit care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Storage of the reagents: We recommend the storage of 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 multichanel 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:

Macerate 1 gr of the sample (rabbit liver) in 2 ml of diluent. After a good homogenisation of the sample, centrifuge the homogenate for 10 min. at 1000 rpm. The supernatant obtained will be used as the assay sample.

VI. 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 of concentrate solution and 960 ml of water). Once this solution ready, it remains stable between +2°C and +8°C.
- **Preparation of the conjugate to make immediately before use:**
Dilute the needed quantity of conjugate provided in the Kit 1/100 with diluent (e.g. 10µl of conjugated with 1 ml of diluent is more than enough quantity for a strip of 8 wells). Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.
- **Preparation of the control (+) and (-):**
Prepare a 1/100 dilution of the control samples provided with the kit in diluent (5 µl of control sample in 500 µl of diluent).

VII. TEST PROCEDURE

1. Take out the plate (or strips to be used) from the refrigerator and keep it 15 min at room temperature before starting the test.
2. Add 100 µl of positive control, diluted as it's specified in the previous instructions, to one well (e.i A1) and 100 µl of the negative control (prepared as is specified before) to another well (e.i. B1). Add 100 µl of each sample to test on each remainder wells. We recommend running the samples in duplicate wells.
Seal the plate and **incubate for 1 h at 37°C.**
3. Throw away the liquid contained in the plate on a recipient containing NaOH 0.1M. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate (prepared as specified) to each well. Seal the plate and **incubate 1 hour at 25°C (room temperature).**
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate solution to each well. Keep the plate for **5 min at room temperature.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well. It is recommended to add this reagent in the same order than was used for adding the substrate.
8. Read the OD of each well 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 of the Test:

The test is valid if:

$$OD_{450} \text{ Control (+)} > 1$$

$$OD_{450} \text{ Control (-)} < \text{cut off}$$

B. Results Interpretation:

The Cut Off value is the 15% of the OD₄₅₀ of the positive control sample:

$$\text{Cut of} = 0.15 \times OD_{450} \text{ Control (+)}$$

Samples with an OD higher than the Cut Off must be considered as positive to RHDV, and samples with OD value lower than the Cut Off must be considered as negative to RHDV. If samples in duplicate wells are being run, the OD value for the sample will be the average of OD obtained in both wells.

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:

