



INGEZIM ROTAVIRUS DAS

Prod Ref: 10.RT.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo, para la detección de antígeno de rotavirus tipo A en heces

Double antibody sandwich enzyme immunoassay for detection of rotavirus type A in faecal samples

Ultima revisión / Last revisión: 16-12-08

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	Presentacion Presentation	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos 96 Well microtitration plates (8x12)	1	-
Viales Control Positivo (10x concentrado) Vials containing positive control (10x concentrated)	1	250 µl
Viales Control Negativo (10x concentrado) Vials containing negative control (10x concentrated)	1	250 µl
Viales de Conjugado I (AcM-biotina) 100x concentrado. Vials containing conjugate I (Mab-biotin) 100x concentrated	1	200 µl
Viales de Conjugado II (streptavidina-peroxidasa) 100x concentrado. Vials containing conjugate II (Streptavidin-peroxidase) 100x concentrated	1	200 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente (a la dilución de uso) DE01-01 Bottles with diluent (ready to use) DE01-01	2	125 ml
Frascos de sustrato (TMB) Bottles with Substrate	1	15 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 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 *rotavirus tipo A*. Cuando sobre los pocillos de dicha placa, se depositan las muestras, en el caso de que exista presencia de antígeno de *rotavirus*, este 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 *rotavirus tipo A*, marcado con biotina), capaz de reconocer al antígeno que ha quedado capturado, en el caso de que exista. Para revelar y amplificar la presencia o no de conjugado unido, se añade un segundo conjugado (streptavidina-peroxidasa) que se unirá a la biotina presente. Tras añadir el sustrato adecuado (TMB), ocurrirá una reacción coloreada medible en todos aquellos pocillos en los que exista peroxidasa, es decir en aquellos en los que la muestra contuviera antígeno específico de *rotavirus tipo A*.

Gracias a la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo, los resultados obtenidos con la aplicación de este kit son 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 pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Usar únicamente agua destilada para la preparación de los reactivos.
9. Incluir sistemáticamente 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 y ha de ser manipulado con precaución.

III. CONSERVACION DEL KIT:

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C, excepto los controles que deberán mantenerse siempre a -20°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. 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 μ l 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 REACTIVOS:

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada.
- **Sueros Control (+) y (-):**
Antes de su utilización, realizar para cada control, una dilución 1/10 en diluyente: 10 μ l de control suministrado en 90 μ l de diluyente.
- **Preparación de los conjugados I y II: A realizar inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar de forma independiente, para cada uno de los conjugados, una

dilución 1/100 en diluyente diluyente suministrado:

- Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 10 μ l de conjugado concentrado hasta 1 ml de diluyente.
- Para una placa completa recomendamos diluir 110 μ l de conjugado hasta 11 ml de diluyente.

Prepara únicamente el volumen de cada conjugado, estrictamente necesario para cada prueba, ya que la solución sobrante debe ser desechada.

VI. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Se homogenizan las heces al 10% (p/v) en el diluyente suministrado (p.ej. 0,1 g en 1 ml del diluyente), centrifugándose a continuación a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido, será utilizado como muestra en el ensayo.

VII. PROCEDIMIENTO:

1. Sacar las placas o tiras que se vayan a usar de la nevera y mantenerlas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 μ l de control positivo (diluído según instrucciones anteriores) en los dos primeros pocillos, 100 μ l de control negativo en otros dos pocillos. Dispensar 100 μ l de cada una de las muestras en los pocillos restantes. Es recomendable testar las muestras también en duplicado. Tapar la placa e **incubar 1 hora a 37°C.**
3. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0,1M y lavar 4 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 μ l de Conjugado I (AcM-biotina), preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 1 hora a 37°C.**
5. Vaciar los pocillos sobre un recipiente que contenga NaOH 0,1M y lavar 4 veces según procedimiento descrito.

6. Añadir 100 µl de Conjugado II (streptavidina-peroxidasa), preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa e **incubar 30 minutos a temperatura ambiente**.
7. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
8. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción **durante 10 minutos a temperatura ambiente**, en obscuridad.
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
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.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Validación del test:

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

DO (Control Negativo) < 0,200

DO (Control Positivo) > 1,000

Interpretación de resultados:

En el caso de haber ensayado las muestras por duplicado, deberá hallarse para cada muestra la media aritmética de las DO obtenidas. Una vez obtenido este dato se procederá del siguiente modo:

1º. -Calculo de la DO corregida para cada muestra:

Se calculará substrayendo de cada valor de DO obtenida, el valor de DO obtenido para el control negativo:

DO corregida = DO muestra – DO Control negativo

2º. - Interpretación:

- 1 Cuando el valor de DO corregida, sea superior a 0,300, la muestra se considerara positiva para antígeno de Rotavirus tipo A.
- 1 Cuando el valor de DO corregida sea inferior a 0,200, la muestra se considerará negativa para antígeno de Rotavirus tipo A.
- 1 Para valores de DO corregida comprendidos entre ambos valores, las muestras serán consideradas dudosas. En estos casos deberá repetirse el ensayo y utilizar otra técnica o recogerse una nueva muestra del individuo.

I. THE TECHNICAL BASIS

he kit is based on a double antibody sandwich enzymatic immunoassay (**DAS-ELISA**). We make a brief description of the technique below:

We fix a monoclonal antibody (Mab) specific for Rotavirus on a solid support (Polystyrene plate). When a faecal sample contains the virus, the Mab will catch the viral antigen. After washing to eliminate all non-fixed material from the sample, we can detect

the presence of viral antigen using a rotavirus-specific Mab biotin-conjugated. After additional washing, we add a second conjugate (Streptavidin-peroxidase) which will allow the colour development in the presence of the substrate, during the last step of the assay.

In this way, the presence of colour means the presence of the virus in the sample and the absence of colour, the absence of viral antigen.

II. PRECAUTIONS AND WARNING 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. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. Distilled water must be used for reagents preparation.
9. For each utilisation of the kit, positive and negative control must be tested in a systematic way.
10. 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.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care.

III. STORAGE OF THE KIT COMPONENTES:

Store all plates and reagents between +2°C and +8°C, except controls that must be stored 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:

Homogenise 0.1 g of faecal sample in 1 ml of diluent (10% p/v).
Centrifuge at 1500 rpm for 10 minutes and collect the supernatant.



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. When ready this solution remains stable stored at 4°C.
- **Preparation of controls (+) and (-):**
Make 1/10 dilution in the supplied diluent before use.
- **Preparation of the conjugates 1 and 2: to make immediately before use.**
Dilute 1/100 with 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 positive control, diluted as it's specified in the previous instructions, to two wells of the first row of the plate and 100 µl of the negative control to another two wells. Add 100µl of each sample to test, prepared following the previous instructions, on the remainder wells of the plate (is recommended to run samples in duplicate wells). Seal the plate and incubate for **60 min at 37°C**.
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate 1, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate **for 60 min at 37°C**
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of conjugate 2, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and incubate **for 30 min at room temperature (20-25°C)**.
7. Wash 5 times following the described procedure
8. Add 100 µl of substrate. Keep the plate for **10 min at room temperature** in darkness.
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Read the absorbances of each well with an ELISA reader at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. TEST PROCEDURE:

The reading must be done at 450 nm.

Validation of the plate:

For validation, OD values of the controls have

to fulfil these requirements:

OD of Positive control > 1.0
OD of Negative control < 0.2

Results Interpretation:

1º.- Calculate the corrected OD (cOD) for each sample:

$cOD = \text{sample OD} - \text{negative control OD}$

2º.- Interpretation :

Samples with a cOD higher than 0.3 are positives. If the cOD value is lower than 0.2, the sample is negative.

Samples with cOD ranged between these two values must be considered doubtful and should be 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: