

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM RHDV

Prod Ref: 17.RHD.K1

Ensayo inmunoenzimático para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente al virus de la enfermedad hemorrágica del conejo en suero.

Indirect Enzymatic Immunoassay for detection and/or titration of antibodies to Rabbit Haemorrhagic disease in rabbit sera samples

Última revisión / Last revision: 30-05-14
Nº de registro en España / Spanish registration number: 3198-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates	
	Unid	vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras, tapizadas 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8) coated	2	-
Viales conteniendo suero Control Positivo para RHDV Vials containing RHDV Positive Control sera	1	4 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo para RHDV Vials containing RHDV Negative Control sera	1	4 ml
Viales conteniendo conjugado concentrado 100x. Vials with conjugate 100x concentrated	1	350 µl
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente de suero (DE01-05) concentrado 5X Bottles containing serum diluent (DE01-05), 5x concentrated	1	100 ml
Frascos conteniendo sustrato (ABTS). Bottles containing substrate (ABTS)	1	30 ml
Frascos conteniendo solución de frenado (SDS). Bottles containing stop solution (SDS)	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 405 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 (405 nm filter)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán adheridos a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de conejo mediante un conjugado marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente a la enfermedad, mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

Con esta técnica, pretendemos facilitar y automatizar el diagnóstico de esta enfermedad, que hasta el momento viene realizándose por Inhibición de la Hemaglutinación.

Este kit es apto tanto para realizar "screening" como para realizar titulaciones en función de las necesidades de cada usuario. Hemos adaptado el kit para tres supuestos:

1. Screening: Mediante este procedimiento se determinará (a un solo pocillo por suero) la presencia o no de anticuerpos, sin titular.

2. Titulación : Realizando una serie de diluciones de cada suero, se determina cual es la máxima dilución en la que se puede verificar la presencia de anticuerpos, siendo esta dilución el título para esa muestra. Siguiendo este procedimiento, se requieren entre 4 y 8 pocillos por suero (depende de las diluciones que se utilicen).

3. Verificación de protección : Su utilidad es determinar si los animales se encuentran bien inmunizados frente a esta enfermedad. Las experiencias llevadas a cabo en nuestro laboratorio, demuestran que un valor de absorbancia mayor o igual a 0,9 a la dilución 1/200, supone una tasa de anticuerpos suficiente para proteger a los animales frente a infecciones experimentales.

En nuestro kit es de resaltar la utilización de antígeno viral obtenido por ingeniería genética, más concretamente por expresión de la proteína viral mayoritaria y de máximo poder antigénico, en baculovirus crecidos sobre células de insecto. Esto garantiza la total laboratorización, demuestran que en cualquiera de los componentes del kit.

La comparación realizada entre esta técnica diagnóstica y la inhibición de la Hemaglutinación de eritrocitos humanos tipo O, demuestra una correlación perfecta entre ambas técnicas, siendo este inmunoensayo hasta 10 veces más sensible.

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 tampón 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), excepto el conjugado que debe conservarse a -20° C.

¡ATENCIÓN! La solución de frenado puede precipitar a esta temperatura, si esto sucede, se puede poner a 37°C hasta su total disolución.

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:

Para la realización de screening, los sueros problema se utilizarán a la dilución 1/200 en diluyente suministrado (5 µl de suero hasta 1 ml con diluyente).

Para la realización de una titulación, se recomienda realizar diluciones factor dos a partir de la dilución 1/200, y hasta la dilución que interese. Habitualmente

son suficientes 4 diluciones: 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600.

Para la verificación de la protección, los sueros se utilizarán a la 1/200.

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.

- **Diluyente:**

Diluir una parte de Diluyente concentrado 5x suministrado, en 4 partes de agua destilada. Una vez preparada permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C, durante largos periodos.

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

Los sueros controles se presentan a la dilución de uso.

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

Realizar una dilución 1/100 en diluyente diluido según instrucciones anteriores:

→ Para una tira de 8 pocillos recomendamos diluir 10 µl de conjugado concentrado en 1000 µl de diluyente.

→ Para una placa completa recomendamos diluir 100 µl de conjugado en 10 ml de diluyente.

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

Homogenizar muy bien la solución preparada antes de su utilización.

- **Sustrato:**

Se presentan a la dilución de uso.

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 en los primeros dos pocillos, 100 µl de control positivo, en otros dos pocillos, 100 µl de control negativo, y en el resto de los pocillos 100 µl de cada una de las muestras o diluciones de las muestras a ensayar. Sellar la placa **e incubar 1 hora a 37°C**.
3. Lavar la placa 3 veces según el procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores, en cada pocillo. Sellar la placa **e incubar 1 hora a temperatura ambiente (25°C)**.
5. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. **Mantener la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.**
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 405 nm en los 5 min. Sigüientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

A. Validación del test:

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

$$\frac{\text{DO (control +)}}{\text{DO (control -)}} > 10$$

B. Interpretación de resultados:

A.- Cálculo del punto de corte:

El punto de corte (CUT OFF), es en todos los casos 0,300.

- ◆ *Si se ha utilizado el procedimiento de screening:*
Todas las muestras que presenten valores de DO superiores a 0,300, serán consideradas como positivas a anticuerpos frente a RHDV y

las que presenten valores inferiores, como negativas.

- ◆ *Si se ha utilizado el procedimiento de titulación:*
El título de la muestra será la máxima dilución que presente un valor de DO superior a 0,300.
- ◆ *Si se ha utilizado el procedimiento de verificación de la protección:*

Según nuestra experiencia, cuando las muestras ensayadas a la dilución 1/200, presenten un valor de DO igual o superior a 0,900, el título de anticuerpos presente en esa muestra, indica que el animal está correctamente inmunizado frente a infecciones experimentales con el RHDV.

Antes de poder aplicar este procedimiento, es muy recomendable realizar un muestreo representativo de la población a controlar, en el que se titule el contenido de anticuerpos de los sueros de los animales y así puedan ajustarse los valores estándar para cada explotación particular. Si lo consideran oportuno, pueden consultar con nuestro departamento técnico a la hora de llevar a cabo este ajuste

INGEZIM RABBIT 17.RHD.K1

I. TECHNICAL BASIS

The kit is based on the indirect immunoenzymatic assay technique described below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). The antigen is recombinant protein from RHDV obtained using the baculovirus system of expression.

The serum sample is added to each well. After incubation, a peroxidase conjugate (Protein A) is added. If serum sample contains antibodies specific of RHDV, the conjugate will bind to them, whereas if it does not contain specific antibodies no binding will be appreciated.

After washing the plate to eliminate all non fixed material, we can detect presence or absence of

conjugate by adding the substrate which, in presence of the peroxidase, will develop a colorimetric reaction.

The assay has been compared with hemagglutination inhibition technique with the highest ratios of sensitivity and specificity.

The kit could be used both for screening and for titration purposes. We have adapted the conditions for verifying in a very ease way the level of protection of a vaccinated herd. The process is based on experimental infection trials. Using this procedure the verification of the protection level could be done using the screening scheme at a single dilution.

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 and negative control sera must be tested in a systematic way.
10. Substrate and substrate buffer must by handle whit care.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Store plates and reagents between +2°C and +8°C except the conjugate that must be placed at -20°C as soon as the kit is received. The conjugate is supplied in a glycerol solution that warrants the conservation of the reagent in liquid phase even under -20°C.

ATTENTION! Stop solution may precipitate at this temperature, if it happens, warm at 37°C till total dissolution

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:

FOR TITRATION PURPOSES:

We recommend to make at least four 2 fold dilutions from 1/200 (1/200, 1/400, 1/800 and 1/1600), but depending on the goal, higher dilutions could be done. Dilution must be done in the supplied Diluent.

FOR SCREENING PRUPOSES:

Before assaying, sera samples must be diluted 1/200 in the supplied Diluent (5 µl of serum sample to 1 ml with diluent).

This is also the procedure recommended for the verification of the protection of animals..

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.
- Diluent:**
Dilute one part of the concentrate diluent provided in the Kit with 4 parts of distilled or deionized water.
- Control Sera:**
Controls are ready to use.
- Preparation of the conjugate (to make immediately before use):**
Dilute the needed quantity of conjugate provided in the Kit 1/100 with the provided diluent:
 - The necessary and sufficient quantity of conjugate for a complete plate is 110 µl of Conjugate with 11 ml of diluent.
 - The necessary and sufficient quantity of Conjugate for an eight wells strip is 10 µl of conjugate with 1 ml of conjugate diluent. Shake very well the solution before use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.**Substrate:** Substrate is ready to use.

VII. TEST PROCEDURE

- Take out the plate (or strips to be used) from the refrigerator and keep it 15 min at room temperature before starting the test.
- Add 100 µl of positive control serum and 100 µl of negative control serum to A1 and B1 wells respectively.
Add 100 µl of each sera sample (prepared as specified) to each remainder wells of the assay plate. For high accuracy it is recommended to run samples and controls in duplicate. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
- Wash 3 times following previous instructions
- Add 100 µl of conjugate (prepared as specified) to each well. Seal the plate and **incubate 1 hour at 25°C (room temperature)**.
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature**.
- 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.
- Read the OD of each well at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **405 nm**.

A. Validation of the Test:

To validate the assay, the ratio OD (Positive Control) / OD (Negative control) must be higher than 10.

B. Interpretation of the Results:

A. Cut off calculation:

Cut off Positive/Negative is 0,300.

Hence, samples with an OD higher than 0,300 must be considered as positives and samples with OD lower than 0,300 must be considered as negatives.

- SCREENING PURPOSES:**

All samples with OD higher than 0,300 must be considered as positives, and samples with OD lower than this value, must be considered as negatives.

- TITRATION PURPOSES:**

The sera titer will be the highest dilution with an OD higher than 0.3.

- PROTECTION VERIFICATION:**

After running correlation trials for titer / OD value, we can estimate than samples with an OD value (at a 1/200 dilution) higher than 0.9, are enough protected to experimental infection with RHDV. Anyhow this is a general orientation that could vary depending on the vaccination plans, etc. In order to establish your particular level of protection, we recommend running your own seroprofiles using the titration procedure

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