

INMUNOLOGIA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.



INGEZIM MIXOMATOSIS

Prod Ref: 17.MIX.K1

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

Indirect Enzymatic Immunoassay for detection and/or titration of specific antibodies to mixomatosis virus in rabbit serum samples

Última revisión / Last revision: 23-02-12
Nº registro: 3367-RD

COMPOSICION DEL KIT ELISA
ELISA 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 Vials containing Positive Control sera	1	4 ml
Viales conteniendo suero Control Negativo Vials containing Negative Control sera	1	4 ml
Viales conteniendo conjugado listo para su uso. Vials with conjugate ready to use	1	30 ml
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 (TMB). Bottles containing substrate (TMB)	1	30 ml
Frascos conteniendo solución de frenado (H ₂ SO ₄ 0,5M). Bottles containing stop solution (H ₂ SO ₄ 0,5M)	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 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 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.

Este kit es apto tanto para realizar "screening" como para titulación.

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 muy sensible a la luz y a las contaminaciones. Retirar del bote de sustrato únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver el sobrante al bote.
11. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte.

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 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:

Los sueros problema se utilizarán a la dilución 1/200 en diluyente suministrado (5 µl de suero hasta 1 ml con diluyente).

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.:**

El conjugado se presenta listo para su uso

VII. PROCEDIMIENTO

1. Sacar las placas o tiras que se vayan a usar de la nevera y atemperar antes de usar.
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 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, 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 450 nm en los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realiza a 450nm.

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:

DO del C positivo / DO C negativo > 5

B. Interpretación de resultados:

A.- Cálculo de los puntos de corte:

Punto de corte negativo

DO del control negativo + 0.15

Punto de corte positivo

DO del control negativo + 0.2

Todas las muestras que presenten valores de DO superiores al punto de corte positivo, serán consideradas como positivas a anticuerpos frente al virus de la mixomatosis, y las que presenten valores inferiores al punto de corte negativo serán consideradas negativas.

Aquellas muestras con DO entre ambos puntos de corte se considerarán dudosas y se recomienda repetir el ensayo

C. Título:

Si se desea conocer el título de la muestra, positiva:

- 1) Calcular la relación DO muestra/DO control+(M/P)
- 2) Sustituir la X por este valor en la fórmula

$$\text{Título} = 2000 \cdot x^{1.4}$$

EJEMPLO.

DO del control positivo = 1.692

DO del control negativo = 0.150

Punto de corte negativo = 0.15 + 0.15 = 0.300

Punto de corte positivo = 0.15 + 0.2 = 0.350

Abs **Muestra A** = 1.02 positiva (>0,350)

Título

a) $M/P = 1,02/1,692 = 0,603$

b) $\text{Título} = 2000 \times 0,603^{1.4} = 985$

INGEZIM MIXOMATOSIS 17.MIX.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 serum sample is added to each well. After incubation and a washing step, a peroxidase conjugate is added. If serum sample contains antibodies specific of myxomatosis virus, 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 kit could be used both for screening and for titration purposes.

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. **IMPORTANT** TMB Substrate must be handle with care, it is very sensible to light and contamination: pipette a sufficient amount for the assay from the substrate storage bottle into a separate dark container prior to colour develop step.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care

III. STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2 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:

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

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.
- **Conjugate:** Ready to use. Do not dilute

VII. TEST PROCEDURE

1. Take out the plate (or strips to be used) from the refrigerator and bring to room temperature before starting the test.
2. Add 100 µl of positive control serum and 100 µl of negative control serum in duplicate wells. Add 100 µl of each sera sample (prepared as specified) to each remainder wells of the assay plate. Seal the plate and **incubate for 1 hour at 37°C**.
3. Wash 3 times following previous instructions
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate 1 hour at 25°C (room temperature)**.
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate **for 10 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 at 450nm. If you run controls and samples in duplicate wells, the arithmetic mean of the OD must be considered.

A. Validation of the Test:

OD Positive Control / OD Negative Control > 5.

B. Interpretation of the Results:

A. Cut off calculation:

Cut off Negative

OD Negative control + 0.15

Cut off Positive

OD Negative control + 0.2

All samples with OD higher than cut off positive must be considered as positives, and samples with OD lower than cut off negative, must be considered as negatives. Samples with OD between both values must be considered doubtful.

C. Titre of Samples:

If you want to know the titre of positive samples:

- 1) Calculate the ratio OD Sample/OD control + (S/P)
- 2) Substitute "x" in the formula with this S/P value
Titre = 2000 . x^{1.4}

EXAMPLE

Positive Control OD = 1.69

Negative Control OD = 0.15

Cut off Negative = 0.15 + 0.15 = 0.300

Cut off Positive = 0.15 + 0.2 = 0.350

Abs **Sample A** = 1.02 (>0,35 , positive)

Titre = 2000 x 0,603^{1.4} =985

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: