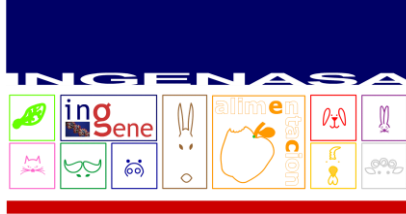


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



EIA RABIA

Prod Ref: 40.RAB.K2

Reactivos para la determinación de carga viral en vacunas EIA de doble anticuerpo.

Reagents for determination of viral charge in vaccines by performing a Double Antibody Sandwich EIA.

Ultima revisión / Last revision: 28-11-07

**Solo para investigación y sin valor diagnóstico.
Only for investigation. Without diagnostic value.**

REACTIVOS INCLUIDOS
REAGENT SUPPLIED

Reactivo Reagent	2 placas (8x12 pocillos) 2 plates (8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placa de poliestireno tapizada con anticuerpo monoclonal MAB-Coated plate divided in 12 strips of 8 wells each	2	-
Vial Conjugado I específico concentrado 100x (AcM marcado con biotina) Vials with Conjugate I (Mab labelled with Biotin)	1	300 µl
Vial Conjugado II concentrado 100x (estreptavidina marcada con peroxidasa) Vials with conjugate II (Streptavidin labelled with peroxidase)	1	300 µl
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente I para dilución de muestras y Conjugado I Bottles with diluent I This diluent is used for the sample dilution and the Conjugate I dilution.	1	125 ml
Frascos de Diluyente II para diluir en conjugado II Bottles with diluent II to dilute the Conjugate II	1	125 ml
Frasco sustrato (TMB) Bottle with substrate (TMB)	1	30 ml
Frascos de Solución de Frenado a la dilución de uso (Acido Sulfúrico) Bottles with Stop Solution (Sulphuric acid)	1	65 ml

I. FUNDAMENTO TECNICO

Los reactivos se utilizaran en un inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo (sandwich).

Las placas se suministran tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos frente a la glicoproteína del virus de la Rabia. Cuando sobre las placas se dispensan las muestras, en el caso de que contengan antígeno viral, éste será capturado por los anticuerpos monoclonales de la placa.

Tras lavar para eliminar el material no adherido se añade un segundo monoclonal conjugado con biotina. En presencia de antígeno, existirá unión del monoclonal a éste y después de incubar con un segundo conjugado (estreptavidina-peroxidasa), podrá revelarse la presencia o no del conjugado mediante la adición de un cromógeno y sustrato adecuado.

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. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
5. No comer, beber, ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca.
7. Utilizar una punta nueva por cada muestra a testar.
8. La solución de frenado es un ácido fuerte, por lo que debe ser manipulado con precaución. En caso de contacto con piel y ojos, lavar inmediatamente con agua abundante.
9. El sustrato es muy sensible a la luz y las contaminaciones. Por ello se recomienda sacar del bote únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver al bote la solución sobrante.

III. CONSERVACION

Todos los reactivos que se suministran con el kit, deben mantenerse en refrigeración entre +2°C y +8°C hasta su utilización.

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 titulación de las muestras, se recomienda realizar ocho diluciones en base 2 a partir de la 1/10, en diluyente I.

VI. PREPARACION DE 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 del conjugado I:

Diluir el concentrado 1/100 en el diluyente I proporcionado. Agitar muy bien antes de usar. Diluir únicamente la cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

Por ej.: 10 µl de conjugado I con 990 µl de diluyente I es la cantidad necesaria y suficiente para ocho pocillos.

◆ Preparación del conjugado II:

Diluir 1/100 en el diluyente II. Agitar muy bien antes de usar. Diluir únicamente la cantidad que se vaya a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

Por ej.: 10 µl de conjugado II con 990 µl de diluyente II es la cantidad necesaria y suficiente para ocho pocillos.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Preparar las tiras necesarias de la placa, y mantenerlas 15 min. A temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl/pocillo de cada dilución de las muestras. Tapar la placa, e **incubar 1 h a 37°C.**
3. Lavar 3 veces.
4. Añadir 100 µl de conjugado-biotina (diluido 1/100 en diluyente I) a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 1h a 37°C.**
5. Lavar 4 veces.
6. Añadir 100 µl de conjugado-peroxidasa (diluido 1/100 en diluyente II) a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar a 30 minutos a 25°C** (Temperatura ambiente).
7. Lavar 5 veces.
8. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo, y mantener la reacción durante **10 min a temperatura ambiente.**
9. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo.
10. Leer a 450 nm de longitud de onda en los siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. INTERPRETACION DE RESULTADOS:

1. En este producto no se incluyen controles por lo que los usuarios deberán preparar sus propios estándares y establecer unos criterios de validación y de interpretación acordes con su proceso.
2. El ensayo no está evaluado para utilizarse con fines diagnósticos.
3. INGENASA no se responsabiliza de los resultados que puedan derivar del uso inadecuado del producto o de la elección de estándares erróneos.

ATENCIÓN: Este producto no es un producto validado. Sólo debe utilizarse para control interno de procesos. El uso de los EIA para Rabia podría estar restringido en algunos países. Por favor, consultar la reglamentación en vigor.

I. TECHNICAL BASIS

The reagents will be used a Double antibody sandwich enzyme immunoassay.

Here we describe the technical basis of the assay: a specific monoclonal antibody (Mab) against Rabies virus glycoprotein is coated on a solid support (polystyrene plate). When a sample containing viral antigen is added, the Mab will capture antigen. After washing (to remove all material not bound to the plate), we add a second specific MAb to glycoprotein labelled with biotin (conjugated I).

This MAb will bind to it, and after incubation with a second conjugate (streptavidin-peroxidase), we could demonstrate the presence of this conjugate (conjugate II) by adding a chromogenic substrate that in presence of the enzyme will produce a colorimetric reaction.

II. PRECAUTIONS:

1. Read the instructions of use 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. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled.
6. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. Stop solution is a strong acid. Handle with care.
9. Substrate is very sensitive to light and contamination.

III. STORAGE:

Store all reagents between +2°C y +8°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:

1. Throw out the content of 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.
plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
2. Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well.
3. Shake delicately the plate, avoiding the contamination between wells.
4. Turn over the plate brusquely to empty the wells.
5. Repeat the process as much times as is indicated on the instructions of the kit.
6. Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper

V. PREPARATION OF SAMPLES:

To titrate the samples it is recommended to make eight dilutions in fold of 2 from 1/10 dilution in sample diluent I.

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 I: to make immediately before use.**

Dilute 1/100 the needed quantity of conjugate with diluent I (e.g. 10 µl of conjugate I with 1 ml of diluent I 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 conjugate II: to make immediately before use.**

Dilute 1/100 the needed quantity of conjugate II into diluent (e.g. 10 µl of conjugate II with 1 ml of diluent II, is 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

VII. TEST PROCEDURE:

1. Take out the plate (or strips to be used) and maintain 15 min. to room temperature before starting the test.
2. Add 100 µl/ pocillo of each sample. Seal the plate and **incubate for 1 h a 37°C.**
3. Throw away the liquid contained in the plate on a recipient containing NaOH 0.1 M. Wash 3 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate I, prepared following the previous instructions, to each well. Seal the plate and **incubate for 1 h a t 37°C.**
5. Wash 4 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of Conjugate II, prepared following the previous instruction, to each well. **Incubate 30 minutes at room temperature (25°C).**
7. Wash 5 times more following the described procedure.
8. Add 100 µl of substrate. **Keep the plate for 10 min at room temperature.**
9. Add 100 µl of stop solution to each well.
10. Read the absorbance of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. INTERPRETATION OF THE RESULTS

1. In this product, controls are not included, thus the users must prepare their own standards and establish validation and interpretation criteria in agreement with their process.
2. The product has not been evaluated to be used for diagnosis.
3. INGENASA is not responsible of the results derived from an inadequate use of the reagents or for the wrong selection of standards.

ATTENTION! This product is not a validated one. Just for internal uses. The use of EIA could be prohibited in some countries. Please, observe local state and federal rules for proper use.



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:



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2