



## PROCEDIMIENTO PARA ENSAYOS DE ELISA PARA ANIMALES DE LABORATORIO - 2 PLACAS

Reactivos de Investigación para la Detección de Anticuerpos en suero de animales por ELISA

Almacenar a temperatura de 2 a 8°C  
Solamente para Uso en Investigación (RUO)

### REACTIVOS:

Se suministran reactivos suficientes para 96 pruebas.

**NOTA:** Los lotes de las placas y el conjugado deben ser usados en conjunto (no mezclarse). Todos los reactivos están listos para usar EXCEPTO el de Lavado que se suministra en una concentración 20X.

Tiras de ELISA	2 soportes de tiras que contienen 6 tiras cubiertas con antígeno viral positivo y 6 tiras cubiertas con antígeno negativo (alternando tiras con antígeno + y -)
Diluyente de Muestra	2 frascos, 30 ml cada uno
Conjugado de Peroxidasa	2 frascos, 12 ml cada uno
Substrato de Peroxidasa, ABTS	2 viales, 12 ml cada uno
Solución de Parada	1 vial, 10 ml
Solución de Lavado Concentrado (20X)	2 viales, 60 ml cada uno
Suero Control Positivo	1 vial de 1ml
Suero Control Negativo	1 vial de 1ml

### INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene todos los reactivos a temperatura de 2 a 8°C cuando no se estén usando. La fecha de vencimiento impresa en la etiqueta de la caja indica el límite de estabilidad del producto.
2. Los paquetes de papel aluminio que contienen las tiras de ELISA deben dejarse a temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de abrir para prevenir la condensación. Una vez abiertas, las tiras deben ser almacenadas de 2 a 8°C hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta, siempre que se mantengan en condiciones de desecamiento.

### INSTRUCCIONES DE USO

**Preparación de Reactivos** Prepare los siguientes reactivos y muestras antes de comenzar el procedimiento. Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura de (20 - 25 °C) antes de comenzar el ensayo y deben permanecer a temperatura ambiente durante la prueba. Retornar los reactivos a temperatura de 2 a 8°C inmediatamente después de su uso.

#### Diluyente de Muestra – 2 frascos (30 ml)

Contiene suero normal de cabra y bovino en solución salina tamponada en fosfato y Proclin como preservativo. El diluyente de la muestra es estable como mínimo por 1 año cuando se almacena a temperatura de 2 a 8°C.

#### Suero Control POSITIVO - 1 vial (1 ml)

Este vial contiene suero control positivo listo para uso a la dilución usada en el ensayo. NO SE REQUIERE DILUCION adicional. El suero control es estable como mínimo por 1 año cuando se almacena a temperatura de 2 a 8°C.

#### Suero Control NEGATIVO - 1 vial (1 ml)

Este vial contiene suero control negativo listo para uso a la dilución usada en la prueba. NO SE REQUIERE DILUCION adicional. El suero control es estable por 1 año cuando se almacena de 2 a 8°C.

#### Solución de Lavado Concentrado (20X) - 2 frasco (60 ml/vial)

Contiene tampón tris con surfactante. Revisar si la solución del lavado concentrado presenta cristales de sal. Si se han formado cristales en la solución, resolubilizarlos calentando a 37°C hasta que los cristales se disuelvan. La solución de lavado es estable durante 3 semanas a partir de la fecha de preparación si se almacena de 2-8°C. Por esta razón, diluir la solución Lavado Concentrado según sea necesario. Diluir el lavado concentrado 1:20 con agua destilada o desionizada en recipiente de vidrio o plástico con tapa rosca (por ejemplo: adicionar 50 ml de lavado concentrado a 950 ml de agua). Mezclar suavemente por inversión varias veces para evitar la formación excesiva de espuma. Se proporciona lavado concentrado en exceso 1 x 60 ml (volumen 2400ml después de dilución) para garantizar volumen suficiente cuando se usa un lavador de placa automatizado,

#### Conjugado de Peroxidasa - 2 vial (12 ml/vial)

El Conjugado esta listo para usar. Un vial proporciona suficiente Conjugado para 12 tiras (1 placa). Si se requiere mas de 1 vial, mezclar el contenido de ambos viales en un recipiente de vidrio o plástico con tapa rosca y mezclar suavemente por inversión varias veces para evitar la formación excesiva de espuma. Una vez abierto el Conjugado es estable por 30 días. Coloque la fecha en el vial y almacene a temperatura de 2-8°C.

#### Substrato de Peróxidasa, ABTS - 2 vial (12 ml/vial)

Cada vial contiene 12 ml de solución 2,2' Azino-di[3-ethyl-benzthiazoline-sulfonate]. El substrato esta listo para usar. ABTS es estable como mínimo por 1 año a temperatura 2-8°C.

#### Solución de Parada - 1 vial (10 ml)

Contiene 1.25% de fluoruro de sodio. PRECAUCION: Evite el contacto con ojos y piel. Si esto ocurre, lave al área con abundante agua y consulte el médico inmediatamente.

### RECOLECCION DE MUESTRA Y PREPARACION

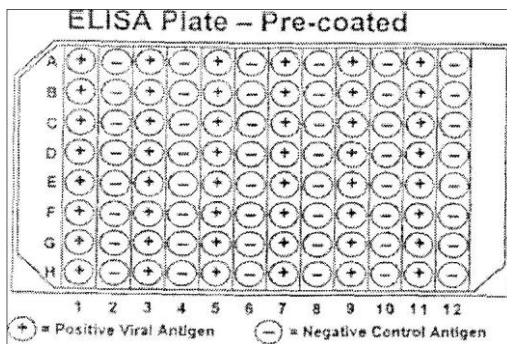
- A. Obtener sangre y dejar que se forme coágulo. Los materiales insoluble se deben eliminar por centrifugación. Obtener el suero asépticamente. Las muestras de suero deben ser refrigeradas lo mas pronto posible después de la recolección. si no se procesan dentro de las 48 horas se deben hacer alícuotas de las muestras y congelar. Evitar congelación y descongelación de las muestras. Las muestras no deben contener acido sódico.
- B. Diluir el suero 1:50 en diluyente de Muestra. Por ejemplo: adicionar 5 ul de muestra de suero a 245 ul de diluyente de Muestra 1X. Si no se procesan inmediatamente, las muestras diluidas deben ser almacenadas a temperatura de -20°C o menor.

### Notas del Procedimiento

1. Revisar las instrucciones completas antes de realizar el ensayo.
2. Las tiras de placa de ELISA son removibles. Remueva las tiras no usadas y almacénelas de acuerdo a las "instrucciones de Almacenamiento y Estabilidad". Antes de comenzar el ensayo, el usuario debe revisar el soporte de las tiras de ELISA y asegurarse que todas las tiras están seguras. Es normal observar un residuo blanco de estabilizante en el fondo de los pozos no usados.

Los soportes de las tiras se deben manejar con cuidado para garantizar que no se desprenda alguna tira durante el proceso del ensayo. Se recomienda que se numere cada tira con un marcador de laboratorio antes de ser usada. Además, como las tiras están pre-cubiertas con antígeno viral positivo y negativo (alternando 6 tiras cubiertas con antígeno viral positivo y 6 con negativo), se recomienda que cada tira se marque con un "+" o "-" para indicar el tipo de antígeno que recubre cada pozo.

**NOTA:** Organice el soporte de tiras comenzando siempre con una tira cubierta con antígeno control positivo (+). Alternar las tiras posteriores entre antígeno control (-) y antígeno viral control positivo (+), para que queden las tiras 1,3,5,7,9 y 11 pre-cubiertas con antígeno viral positivo (+) y las tiras 2,4,6,8, 10 y 12 pre-cubiertas con antígeno control negativo(-). A continuación una representación esquemática:



Evite tocar la superficie del fondo de los pozos. Ya que esto puede afectar las lecturas. Las tiras de ELISA se deben usar una vez solamente. Los soportes de tiras pueden usarse varias veces.

3. Deseche todos los materiales usados como de riesgo biológico
4. Se debe usar una punta nueva de pipeta para cada muestra, nunca tocar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Si se usan fuentes plásticas, asegúrese que tienen uno específico (no use la misma para el conjugado de Peroxidasa y el sustrato de ABTS Peroxidasa).

### Procedimiento de Lavado

Se requiere un adecuado lavado y aspiración de cada uno de los pozos para obtener resultados precisos y confiables. Los pozos se deben lavar 5 veces después de la incubación con muestra y la incubación con conjugado.

1. aspire o deseche el líquido a un recipiente de residuos
2. llene cada pozo con solución de lavado.
3. aspire o deseche el líquido de los pozos.
4. repita los pasos 2 and 3 para 4 ciclos adicional (en total, 5 lavadas).
5. invierta la placa y golpee firmemente sobre papel absorbente para remover el exceso de líquido. Tenga cuidado de no desprender las tiras

### Procedimiento del Ensayo

**Todas las muestras y Controles deben ser evaluados en los dos pozos: control antígeno viral positivo y control negativo. Utilice la hoja de registro incluida para identificar la ubicación de cada suero y el tipo de tira (antígeno + o -) usado en el ensayo.**

1. Haga una dilución 1:50 del suero del animal en diluyente de muestra 1X en un tubo pequeño y mezcle bien. Ejemplo: Adicione 5 ul de suero a 245 ul de diluyente de muestra 1X.
2. Coloque en el soporte de tiras el número requerido de tiras recubiertas con antígeno viral control Positivo y Negativo. Marque adecuadamente las tiras con un (+) o (-). Deje un pozo para ser usado para los sueros Control Negativo y un pozo para Control Positivo.
3. Pipetee 100ul de cada una de las muestras de suero, Control Negativo y Control Positivo en los pozos apropiados marcados como (+) and (-).
4. Cubrir los pozos e incubar a 37°C por 45± 1 minutos.
5. Después de la incubación, lavar cada pozo cinco (5) veces con solución de Lavado 1X (referirse al Procedimiento de Lavado).

6. Pipetee 100 ul del Conjugado de Peroxidasa listo para uso en cada uno de los pozos. Cubrir los pozos e incubar a 37°C por 45± 1 minutos.
7. Después de la incubación, lave cada pozo cinco (5) veces con solución de Lavado 1 X (referirse a procedimiento de Lavado).
8. Pipetee 100 ul de Substrato de Peroxidasa, ABTS, listo para uso en cada uno de los pozos de prueba.
9. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25°C) por 30 minutos. No cubrir la placa.
10. Haga blanco el microlector con aire y lea la absorbancia de la reacción colorimétrica en cada uno de los pozos a 405nm.
11. Si la placa no se lee inmediatamente, pipetee 25 ul de la Solución de Parada en cada pozo de prueba. Leer la placa a 405 nm en un tiempo de no mas de 15 minutos.

### INTERPRETACION DE RESULTADOS

1. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios criterios para el desempeño de estos Reactivos de Investigación.
2. En nuestras pruebas de control de calidad, nosotros usamos el siguiente criterio:
  - a. El suero Control Negativo, después de restar la absorbancia en el pozo de antígeno control negativo, debe producir una absorbancia neta en el antígeno viral positivo de  $\leq 0.250$  a 405 nm.
  - b. El suero Control Positivo, después de restar la absorbancia en el pozo de antígeno control negativo, debe producir una absorbancia neta en el antígeno viral positivo de  $\geq 0.600$  a 405 nm.
  - c. Una muestra debe ser considerada positiva por los siguientes criterios: Determinar la diferencia ( $\Delta$ ) entre la absorbancia de la muestra a 405 nm en el pozo de antígeno viral positivo y la absorbancia del pozo de control negativo a 405 nm. **Esta diferencia ( $\Delta$ ) debe ser mayor que o igual a 0.300 para una muestra ser considerada positiva.**

#### Ejemplo # 1: Muestra Positiva

Si se obtiene para una muestra una absorbancia de **1.101** a 405 nm en el pozo de antígeno viral positivo y una absorbancia de **0.190** a 405 nm en el pozo de antígeno control negativo. La diferencia ( $\Delta$ ) entre las anteriores absorbancias es **0.911**. Esta diferencia es mayor que o igual a **0.300**. Esta muestra es considerada Positiva.

#### Ejemplo # 2: Muestra Negativa

Si se obtiene para una muestra una absorbancia de **0.347** a 405 nm en el pozo de Antígeno Viral Positivo y una absorbancia de **0.319** a 405 nm en el pozo de Antígeno Control Negativo. La diferencia ( $\Delta$ ) entre las anteriores absorbancias es **0.028**. Esta diferencia es menor que 0.300. Esta muestra es considerada negativa.

### XpressBio

Teléfono: 301-228-2444 Fax: 301-560-6570  
Línea Gratis in USA: 888-562-8914

[www.xpressbio.com](http://www.xpressbio.com) [xpressbio@xpressbio.com](mailto:xpressbio@xpressbio.com)

