Making Testing Easier

RC BOVINO

ZE/RCB96
ZE/RCB960

Immunoenzymatic test for detection of cow's milk in sheep or goat's milk

Test inmunoenzimático para la detección de leche de vaca en leche de oveja o cabra

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

ZEULAB, S.L.
C/ Bari, 25 dpdo. • 50197 Zaragoza (SPAIN)
Tel.: +34 976 731 533
info@zeulab.com
www.zeulab.com

ENGLISH

SCOPE

RC-BOVINO is a sandwich ELISA test based on the specific detection of bovine IgG. It is a test for the determination of cow´s milk in sheep´s milk, sheep-cheese, goat´s milk and goat-cheese. Working range of RC Bovino is 0-20% of cow's milk when samples are diluted 1:200.

KIT COMPONENTS

	ZE/RCB96	ZE/RCB960
Microtiter plate for 96 tests	1	10
SET STANDARDS (0%, 0.01%, 0.05% and 0.10%)	1	3
CONJUGATE x20	1	3
CONJUGATE DILUENT	1	3
SUBSTRATE	1	1
STOP SOLUTION	1	2

STABILITY AND STORAGE

All kit components must be stored refrigerated (4-12ºC) and protected from light. The kit is provided with a minimum shelf life of 6 months. See kit expiring date on the package.

ADDITIONAL MATERIAL (NOT PROVIDED)

- ✓ Micropipettes.
- ✓ Microtiter spectrophotometer with 450 nm filter.
- ✓ Pestle and mortar (for cheese samples).

SAFETY

Safety clothing should be worn and skin contact with the reagents avoided. Do not ingest. A SAFETY DATA SHEET is available from your local distributor on request.

*Warning: *STOP SOLUTION* contains sulfuric acid. Gloves and other protective clothing must be worn when handling this solution.

NOTES

- The microtiter plate is provided dry in a sealed bag. Take out only the strips to be used. Store the remaining strips in the provided bag at 4ºC.
- The SUBSTRATE solution has a pink colour under normal circumstances. A blue colouring of the SUBSTRATE indicates contamination of the reagent and should be discarded. Protect the reagent from exposure to light and air. Avoid dispensing this solution pipetting directly from the tube because it could be contaminated.
- Do not allow wells to dry out while running the assay.
- Let reagents to reach room temperature before using the kit (at least 30 min). Return it to refrigerator after use.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- Whole, skimmed, fresh and pasteurised milk, and whey samples can be used with this kit. However UHT and sterilization treatments can destroy milk immunoglobulins and results can be underestimated. Therefore, it is not recommended to use this test with samples treated at those temperatures.
- Lab temperature should be between 20 and 24ºC while running the test. Higher or lower temperatures could produce non-lineal calibration curves or low absorbance values respectively.
- For cheese analysis, only qualitative assays should be considered. Positive results will indicate the presence of cow´s milk and negative ones cow´s milk absence in cheese. During the cheese making, the lost of soluble proteins is variable, depending on the variety of cheese and the production system of each cheese maker. Therefore, for a quantitative estimation in cheese, it is recommended to develop specific standards for each variety of cheese.

PREPARATION OF SAMPLES AND REAGENTS

SUBSTRATE , STOP SOLUTION and STANDARDS are ready to use.

Preparation of milk samples

- Ranges of mixtures between 0 and 10%. Dilution 1/100 as follows:
  Mix 0.1 mL of milk sample with 9.9 mL of distilled water
- Ranges of mixtures between 10 and 20%. Dilution 1/200 as follows:
  Mix 1 ml of milk sample with 9 ml of distilled water
  Mix 0.5 ml of first dilution with 9.5 ml of distilled water

Preparation of cheese samples:

- Weight 1 ± 0.1 g of homogenised cheese sample and add 10 mL of distilled water.
- Homogenize the mixture with a pestle and a mortar until a cheese paste is obtained.
- Centrifuge at 3000 x g for 10 minutes (alternatively, it can be filtered through a filter paper).
- The supernatant will be used in the assay.

Preparation of conjugate solution:

Prepare the quantity of conjugate solution required by mixing 1 volume of *CONJUGATE x20* with 19 volumes of *CONJUGATE DILUENT*. For instance, for analysing 8 wells it is necessary 8 x 0.05 mL = 0.4 mL of conjugate solution. Prepare 0.5 mL of solution to have a small volume of excess, mixing 0.025 mL of *CONJUGATE x20* with 0.475 mL of *CONJUGATE DILUENT*.

In case of ZE/RCB960, for analysing large number of samples it is recommended to prepare conjugate solution adding the volume of 1 bottle of CONJUGATE x20 to 1 bottle of CONJUGATE DILUENT. This conjugate solution is stable for 5 days when stored under refrigeration (4-12ºC).

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

TEST PROCEDURE

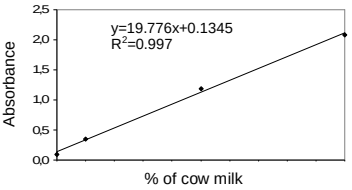
1. Leave the kit components at room temperature for at least 30 min.
2. Add 50 µL of sample or standard into each well. Incubate at 20-24ºC for 30 minutes. Analyse samples and standards by duplicate.
3. Empty the strip / plate by turning the plate upside down and wash the plate/wells with distilled water by adding 300 µL/well of distilled water, when using a micropipette, or filling the well up, when using a squeeze bottle. Empty the wells/plate by turning the plate upside down on top of an absorbent paper to remove the excess of water. Repeat the washing step 2 to 3 times
4. Add 50 µL of conjugate solution into each well. Incubate at 20-24ºC for 30 minutes.
5. Repeat 4 times the washing sequence as in step 3.
6. Add 50 µL of SUBSTRATE into each well. Incubate at 20-24ºC for 30 minutes.

   Note: Pour the volume of SUBSTRATE to be used in a clean container to prevent contamination
7. Add 50 µL of *STOP SOLUTION* into each well and mix gently.
8. Read immediately the absorbance of each well at 450 nm with a microtiter spectrophotometer.

DATA ANALYSIS

Note: A worksheet to calculate the results is available from ZEULAB free of charge. Please, contact us for further information.

1. Obtain a standard curve by plotting % of cow milk in standard samples in a X-axis and absorbance values in the Y-axis. Draw standard curve using a lineal or polynomial fitting. Standard curve goes from 0 to 0.10% of cow's milk. An example of standard curve is shown to the right of this text.



2. To calculate the percentage of cow's milk in the sample is needed to interpolate the absorbance values obtained into the calibration curve and multiply by the diluting factor used. If samples have been diluted 1:100 the working range will be up to 10% of cow milk. If dilution used is 1:200, then the working range is up to 20%.

   Any sample that produces optical density above the value of the highest standard should be further diluted with distilled water and tested again. Dilutions higher than 1:200 are not recommended.

For cheese analysis, only qualitative assays should be considered (see Notes).

PRINTED BY DUTSCHER SAS

OBJETIVO

RC BOVINO es un test para la detección específica de la adulteración de leche o queso de oveja o cabra con leche de vaca. El test es un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA sandwich basado en la detección específica de las IgG bovinas. El rango de trabajo es de 0-20% de leche de vaca cuando las muestras se diluyen 1:200.

COMPONENTES DEL KIT

	ZE/RCB96	ZE/RCB960
Placa microtiter de 96 tests	1	10
SET STANDARDS (0%, 0.01%, 0.05% y 0.10%)	1	3
CONJUGATE x20 (Conjugado x20)	1	3
CONJUGATE DILUENT (Diluyente conjugado)	1	3
SUBSTRATE (Sustrato)	1	1
STOP SOLUTION (Solución stop)	1	2

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Conservar los componentes a 4-12ºC y en oscuridad. El kit se suministra con una caducidad mínima de 6 meses. Consultar la fecha de caducidad indicada en el envase.

MATERIAL Y EQUIPAMIENTO ADICIONAL (NO INCLUIDO)

- ✓ Micropipetas
- ✓ Homogeneizador o mortero (Para análisis de quesos)
- ✓ Espectrofotómetro para placas de ELISA con filtro a 450 nm

PRECAUCIONES DE USO

Se recomienda el uso de buenas prácticas de laboratorio, así como el empleo de ropa y material de seguridad adecuados para el desarrollo del test. Evitar el contacto directo con la piel. No ingerir. Existe una HOJA DE SEGURIDAD disponible bajo solicitud a través de su distribuidor habitual o ZEULAB.

*Atención: *STOP SOLUTION* contiene ácido sulfúrico, para su manejo es imprescindible el uso de guantes y trabajar con precaución.

NOTAS

- Las tiras de los pocillos se suministran secas en una bolsa sellada. Una vez abierta la bolsa, se deben sacar sólo los pocillos que se van a utilizar. El resto se debe almacenar en la bolsa cerrada a 4-8ºC.
- La solución *SUBSTRATE* es sensible a la luz por lo que se debe evitar la exposición directa a ésta. Recuerde que este reactivo posee una coloración rosácea. La aparición de coloración azulada en la solución de sustrato es indicativo del deterioro del mismo y debe ser desechado. Es aconsejable trasvasar la cantidad que se vaya a utilizar en el ensayo a otro tubo.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

- Los pocillos no deben secarse completamente mientras se realiza el ensayo.
- Antes de emplear el kit, debe estar a temperatura ambiente durante al menos 30 min
- El ensayo puede realizarse con leche entera, desnatada, fresca o pasteurizada y con lactosuero. Tratamientos térmicos de UHT y esterilización pueden desnaturalizar las inmunoglobulinas y dar lugar a subestimación; de modo que no se recomienda su uso con muestras que hayan recibido tratamientos térmicos elevados.
- La temperatura óptima de análisis debe situarse entre 20-24ºC. Temperaturas por encima o por debajo pueden originar curvas de calibrado que no conserven la linealidad o curvas con absorbancias más bajas de lo normal respectivamente.
- Cuando se analizan muestras de queso, los resultados sólo pueden ser valorados de forma cualitativa, positivo o negativo, presencia o ausencia de leche de vaca en el queso. Durante el proceso de fabricación del queso la pérdida de proteínas séricas es muy variable, dependiendo del tipo de queso y el sistema de producción utilizado. Para poder hacer una estimación cuantitativa en queso, se recomienda desarrollar unos patrones específicos para cada tipo de queso.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y REACTIVOS

Los reactivos SUBSTRATE, STOP SOLUTION y STANDARDS están listos para usar.

Preparación de las muestras de leche

- Rangos de mezcla entre 0 y 10%. Dilución 1/100:
  Mezclar 0,1 mL de leche con 9,9 mL de agua destilada.
- Rangos de mezcla entre 10 y 20%. Dilución 1/200:
  Mezclar 1 mL de leche con 9 ml de agua destilada
  Mezclar 0,5 mL de leche con 9,5 ml de agua destilada

Preparación de las muestras de queso

- Mezclar 1 ± 0,1 g de queso troceado con 10 mL de agua destilada.
- Homogeneizar la mezcla con un mortero hasta obtener una pasta.
- Centrifugar a 3000 x g durante 10 min (o filtrar en un embudo con papel de filtro).
- El sobrenadante que se obtiene después de centrifugar, se utilizará para el análisis.

Preparación de la solución de conjugado

Preparar la cantidad de solución deseada mezclando 1 volumen de CONJUGATE x20 con 19 volúmenes de CONJUGATE DILUENT. Por ejemplo, para analizar 8 pocillos, se necesitan 0,4 mL (0,05 mL/pocillo) de solución de conjugado. Preparar 0,5 mL de solución para tener un pequeño volumen de exceso mezclando 0,025mL de CONJUGATE x20 con 0,475mL de CONJUGATE DILUENT.

En el caso de ZE/RCB960, para analizar un número elevado de muestras se recomienda preparar el conjugado añadiendo el contenido de 1 bote de CONJUGATE x 20 a un bote de CONJUGATE DILUENT. Esta solución de conjugado es estable durante 5 días conservada en refrigeración (4-12ºC).

MOLINO DE DUTSCHER SAS

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

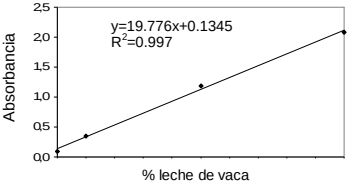
1. Sacar de la bolsa la placa con las tiras que van a ser utilizadas y guardar en la bolsa el resto de tiras. Acondicionar a temperatura ambiente todos los reactivos y pocillos que van a ser empleados (30 min).
2. Aplicar en cada pocillo de la placa 50 µL de muestra o patrón. Incubar a 20-24ºC durante 30 minutos. Analizar muestras y patrones por duplicado.
3. Eliminar el líquido de los pocillos volcando la placa.
4. Lavar los pocillos con agua destilada, añadiendo 300 µL si se usa una micropipeta, o llenando el pocillo si se usa un frasco lavador. A continuación, vaciar los pocillos dando la vuelta a la placa y golpeando la misma suavemente contra papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Realizar este lavado 2 ó 3 veces.
5. Aplicar en cada pocillo 50 µL de solución de conjugado. Incubar 30 min a 20-24ºC,
6. Repetir 4 veces la secuencia de lavados como en los pasos 3 y 4.
7. Aplicar 50 µL de SUBSTRATE por pocillo.Dejar desarrollar el color azul 30 min (20-24ºC)

   Nota: Verter el volumen de SUBSTRATE que se va a utilizar en un tubo limpio para evitar su contaminación.
8. Añadir en cada pocillo 50 µL de STOP SOLUTION para parar la reacción. Mezclar bien dando unos golpes suaves en el borde lateral del marco.
9. Leer inmediatamente la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un espectrofotómetro para placas microtiter.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Nota: ZEULAB dispone de una hoja de cálculo para el análisis de resultados. Contacte con nosotros para su envío gratuito.

1. Representar gráficamente la absorbancia de los patrones (Eje Y) en función del porcentaje de mezcla de cada patrón (Eje X). Dibujar la curva usando un ajuste lineal o polinómico. La curva de patrones va de 0 al 0.10%. A la derecha se presenta un ejemplo de la recta patrón.



2. Para determinar la concentración de leche de vaca en las muestras se debe interpolar el valor de absorbancia de cada muestra y multiplicar por el factor de dilución utilizado. Si las muestras se han diluido 1:100 el rango de trabajo es hasta el 10% y si la dilución es 1:200, hasta el 20%.

   Las muestras con absorbancias superiores a la del patrón de mayor concentración están fuera del rango de detección. Estas muestras deben ser diluidas con agua destilada en una etapa previa y procesadas en un nuevo ensayo. No se recomiendan diluciones de las muestras superiores a 1:200.

En análisis de queso, los resultados sólo se pueden valorar cualitativamente (ver Notas).

PRINTING DUTSCHER SAS

PROCEDURE / PROCEDIMIENTO



1. After preparation of samples, add Standards/Samples.

1. Tras la preparación de la muestra, añadir patrones/muestras.

2. Incubation 30 minutes at room temperature. Wash.

2. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar.



3. Add conjugate and incubate 30 min at room temperature. Wash.

3. Añadir conjugado e incubar 30 min a temperatura ambiente. Lavar.



4. Add substrate and incubate 30 min at room temperature.

4. Añadir substrato e incubar 30 min a temperatura ambiente.

5. Add stop solution and read the results at 450 nm.

5. Añadir solución stop y leer los resultados a 450 nm.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

RC BOVINO is an *in vitro* diagnostic kit. In analysis implicating legal processes, the results should be revaluated with an official reference method. ZEULAB, S.L. does not assume any legal responsibility

RC BOVINO es un test de diagnóstico *in vitro*. Los análisis que pudieran tener una implicación de tipo legal deberían realizarse por duplicado o triplicado y confirmarse mediante un procedimiento oficial. ZEULAB no asume ninguna responsabilidad legal.