



INGEZIM FVR Compac

Prod Ref: 13.FVR.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos frente al virus de la Fiebre del Valle del Rift (FVR), en suero de rumiantes.

Blocking enzymatic immunoassay for the detection of antibodies specific for Rift Valley Fever (RVF) virus in ruminant serum.

Última revisión / Last revision: 26/05/14
Nº registro en España: / Spanish registration number: 3300-RD

COMPOSICIÓN DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo para FVR Vials of Positive Control serum for RVF	1	4 ml	2	4 ml
Viales de suero Control Negativo para FVR Vials of Negative Control serum for RVF	1	4 ml	2	4 ml
Fascos de Conjugado listo para su uso (AcM anti proteína N-HRPO) Bottles with Conjugate, ready to use (Mab anti N protein-HRPO)	1	30 ml	2	30 ml
Fascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Diluyente (DE01-01) a la dilución de uso Bottles with serum diluent (DE01-01), ready to use	1	125 ml	1	125 ml
Fascos conteniendo sustrato (ABTS) a la dilución de uso Bottles with substrate (ABTS), ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	60 ml	1	60 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 TÉCNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de **ELISA de bloqueo**, que se describe brevemente a continuación:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno viral. Sobre el se dispensan los sueros problema que, en caso de ser positivos y poseer anticuerpos específicos se unirán a él. Tras un paso de lavado para eliminar el material no fijado se añade un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa (AcM) específico del antígeno viral. En caso de que la muestra problema contenga anticuerpos estos "ocuparán" el epítipo del AcM y este último no podrá unirse al antígeno. En caso de una muestra negativa el AcM se unirá sin ningún problema y quedará fijado al pocillo. Tras realizar una serie de lavados para eliminar el material no adherido, se procederá a revelar la presencia o no del anticuerpo monoclonal mediante la adición de un sustrato adecuado a la peroxidasa que en presencia de esta dará lugar a una reacción coloreada que se mide en un lector de placas ELISA.

La interpretación de la lectura, será como sigue: Si aparece color, significará que lo que se ha adherido al antígeno de la placa es el anticuerpo monoclonal y por lo tanto nuestro suero problema será negativo para esta patología. Por el contrario, la ausencia de color indicará que los anticuerpos unidos al antígeno son del suero problema por lo que ha de considerarse positivo.

El antígeno adsorbido a la placa se trata en este caso de la proteína estructural N del FVRV producida de forma recombinante, por lo que carece totalmente de infectividad. La proteína N es una de la proteína mayoritaria del virus y la de mayor poder antigénico.

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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. **ATENCIÓN!** La solución de frenado conservada en refrigeración, podría precipitar. Asegurarse de que antes de su utilización, desaparece la precipitación.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al bote el sustrato sobrante.

III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (a 4°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada.

IV. INFORMACIÓN 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. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

○ **Solución de lavado :**

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada (p.ej. 40 ml de concentrado mas 960 ml de agua). Una vez preparada, la solución es estable a +4°C.

○ **Sueros Controles:**

Se presenta listo para su uso. **NO DILUIR.**

○ **Preparación del conjugado:**

Se presenta listo para su uso. **NO DILUIR**

VI. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar una dilución 1/5 en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 80 μl de diluyente y luego 20 μl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente. (es recomendable poner los controles por duplicado)
2. **Adición de los sueros y controles:**
Tapar la placa e incubar durante 45 minutos a 22-25°C.
Añadir 80 μl de diluyente a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar con muestras. Añadir a continuación 20 μl de los sueros problema a ensayar. Añadir en último lugar 100 μl de los controles en sus respectivos pocillos

3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 30 minutos a 22-25°C.
5. Lavar 4 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 405nm.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

A. VALIDACION DE RESULTADOS

- El valor de densidad óptica (DO 405nm) del control negativo (CN) debe ser mayor de 0.8.
- El valor de densidad óptica (DO 405nm) del control positivo (CP) ha de ser menor de 0.25

B. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular el porcentaje de inhibición (PI) de cada muestra:

$$PI \text{ muestra} = 100 - [(DO \text{ muestra} / DO \text{ CN}) \times 100]$$

- Muestras con PI mayores o iguales a 45% serán consideradas como **positivas**
- Muestras con PI menores o iguales a 40% se considerarán como **negativas**.
- Muestras con PI entre 40 y 45% se considerarán **dudosas y se recomienda analizarlas por seroneutralización (SN)**

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a blocking enzymatic immunoassay (Blocking Elisa). The technique is briefly described below:

The antigen is fixed in a solid support (polystyrene plate). After incubating the sera samples, a RVFV specific monoclonal antibody (Mab peroxidase conjugated) is added. If the sample contains antibodies specific of the virus, they will not allow the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies, the Mab will bind to the antigen which is coating the plate.

After washing the plate to eliminate all non-fixed material, the presence or absence of labelled Mabs can

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

If there has been colour development, this means that the conjugate has bound to the antigen, being therefore the sample negative. On the other hand, if the sample contains specific antibodies to RVFV, they will block the binding of the conjugate and there will no colour development will be detected.

The antigen used in this kit is the N recombinant protein from the RVFV. This confers many advantages to the assay. Being produced recombinantly, it therefore totally lacks of infectivity. Plus the N protein is one of the mayor proteins from RVFV, as well as the most antigenic.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit's reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
10. Substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination.
11. Stop solution can precipitate at refrigeration. Make sure there is no precipitation before its use.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored at +4°C.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps can be done using an automatic plate washer 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 instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution

V. PREPARATION OF REAGENTS

○ **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionised water (i.e. 40 ml of concentrate and 960 ml of water). Once prepared, this solution remains stable when stored at +4°C.

○ **Preparation of Controls (+) y (-):**

Both controls are ready to use and do not require any further preparation. Dispense 100 µl of each one.

○ **Preparation of conjugate:**

This reagent is ready to use. Do not dilute

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be assayed at 1/5 dilution in the diluent provided. This dilution can be done directly in the plate by adding 80 µl of the diluent and then adding 20 µl of sample to each well.

VII. TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C).
2. Add 80 µl of the diluent and then 20µl of each sample in every well to be assayed. Add 100µl of positive and negative controls to their respective wells. We recommend running controls in duplicate. **Seal the plate and incubate 45 minutes at 22-25°C.**
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of the ready to use conjugate to each well. **Seal the plate and incubate for 30 minutes at 22-25°C.**
5. Wash 4 times following the procedure previously described.
6. Add 100 µl of the substrate solution to each well. Keep the plate **at room temperature for 10 min.**
7. Add 100 µl of the stop solution to each well.
8. Read the OD of each well at 405 nm.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

When running samples in duplicate, the OD value for each sample should be calculated as the arithmetic mean of both values. In the same way, the arithmetic mean of the values obtained in the two wells of the positive control and the two wells of the negative control must be calculated.

A. VALIDATION OF THE RESULTS

The test is considered valid when:

- The OD of the Negative Control (NC) is higher than 0.8.
- The OD of the Positive Control (PC) is lower than 0.25.

B. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculate the inhibition percentage (IP) of each sample as follows:

$$IP \text{ of sample} = 100 - [(sample \text{ OD} / NC \text{ OD}) \times 100]$$

Samples will be considered **POSITIVE** (i.e. the sample contains specific antibodies to RVFV), when the IP is $\geq 45\%$.

Samples will be considered **NEGATIVE** (i.e. the sample contains specific antibodies to RVFV) when the IP is $\leq 40\%$

Samples with an IP between 40 and 45% should be considered as **DOUBTFUL and be retested by a seroneutralization (SN) assay.**

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:

