



INGEZIM West Nile COMPAC

Prod Ref: 10.WNV.K3

Ensayo inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpos específicos del West Nile Virus.

Blocking immunoenzymatic assay for the specific detection of antibodies to West Nile Virus

Última revisión / Last revisión: **11-06-10**
Registrado por el MAAMA nº 1815 RD

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

REACTIVO REAGENT	2 Placas (T) 2 Plates		5 Placas (T) 5 Plates	
	Unid	vol	Unid	Vol
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras. 96 well microtitration plates divided in strips (12 x 8)	2	-	5	-
Viales conteniendo Control Positivo para WNV listo para su uso. Vials containing Positive Control for WNV ready to use	1	1.25 ml	2	1.25 ml
Viales conteniendo Control Negativo para WNV listo para su uso. Vials containing Negative Control for WNV ready to use	1	1.25 ml	2	1.25 ml
Viales conteniendo Conjugado Especifico listo para su uso Vials containing specific Conjugate ready to use	1	15 ml	2	15 ml
Frascos con Solución de lavado concentrada 25x. Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo diluyente (DE01-01) Bottles containing diluent (DE01-01)	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso. Bottles containing substrate (TMB) ready to use	1	30 ml	1	60 ml
Frascos conteniendo solución de frenado. Bottles containing 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 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

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al West Nile Virus (Virus del Nilo occidental). Es capaz de detectar títulos bajos de anticuerpos en sueros de animales infectados de diferentes especies (aves, équidos, humanos, etc.). La base técnica del kit, es la del ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno viral inactivado. Cuando las muestras de suero se depositan sobre la placa, en el caso de contener anticuerpos específicos, estos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un anticuerpo monoclonal específico del ectodominio de la glicoproteína E conjugado con

peroxidasa. Si las muestras contienen anticuerpos frente al WNV, estos no permitirán la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el monoclonal conjugado a peroxidasa se unirá libremente al antígeno de la placa.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición del un sustrato adecuado que desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de peroxidasa. La aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra ensayada no contenía anticuerpos específicos al WNV y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a 4º C 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. El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
11. La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2ºC y +8ºC).

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. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

- Realizar una dilución 1/5 del suero en diluyente. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 40 µl de diluyente y luego 10 µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

VI. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Controles

Se presentan listos para su uso. No es necesaria dilución alguna.

Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C and +8°C.

Solución de lavado:

Diluir un parte de solución concentrada con 24 partes de agua destilada (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada).

♦ Preparación del conjugado:

Se presenta listo para su uso. No es necesario hacer ninguna dilución.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar los componentes del kit a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.
2. **Adición de los sueros y controles:**
Añadir 50 µl de los sueros diluidos según punto V. Añadir 50 µl de los controles positivo y negativo (es recomendable usar dos pocillos por control). Agitar suavemente, tapar la placa e incubar durante **1 noche (16 a 24 horas) a temperatura ambiente**
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 50 µl de conjugado listo para su uso. Tapar la placa e **INCUBAR 1H A TEMPERATURA AMBIENTE.**
5. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 50 µl de sustrato. Incubar durante **15 minutos a temperatura ambiente.** (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
7. Añadir 50 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 450nm en los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la

media aritmética de los dos valores de DO a 450nm obtenidos. Igualmente se

realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para el control positivo, y los dos pocillos para el control negativo

A. VALIDACION DE RESULTADOS

- El valor de densidad óptica (DO 450nm) del control negativo (CN) debe ser mayor de 0.8.
- El valor de densidad óptica (DO 450nm) del control positivo (CP) ha de ser menor de 0.35

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 40% serán consideradas como **positivas**
- Muestras con PI menores o iguales a 30% se considerarán como **negativas**.
- Muestras con PI entre 30 y 40% se considerarán **dudosas y se recomienda analizarlas por seroneutralización (SN)**

I. TECHNICAL BASIS

The kit has been designed to detect antibodies specific for West Nile virus. The kit is able to detect a very low titer of antibodies in sera of different infected animal species (birds, horses, humans, etc).

The INGEZIM West Nile COMPAC kit is based on the blocking enzyme immunoassay described below:

The plates are coated with inactivated viral antigen. After adding the sample to the well, if it contains specific antibodies against WNV, they will bind to the antigen absorbed on plate while if the sample does not contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

If we add a specific monoclonal antibody (conjugated with peroxidase) against the ectodomain of glycoprotein E of WNV, it will compete with the antibodies of the serum. If the serum samples contain specific antibodies, they will not permit the binding of the labelled Mab to the antigen whereas if it does not contain specific antibodies the Mab will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, we can detect the presence or absence of labelled Mab by adding the substrate (TMB) that in presence of the peroxidase will develop a colorimetric reaction.

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 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 handled.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
10. For each utilisation of the Kit, control positive and negative serum must be tested in a systematic way.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and plates must be stored between +2°C and +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:

- 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:

Sera samples must be tested at 1/5 dilution. This dilution could be made directly on the assay plate by adding 40 µl of diluent and 10 µl of sample to each well.
Mix gently to homogenate the dilution in the well.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water (40 ml of the concentrated solution in 960 ml of distilled or deionised water). Once ready this solution remains stable between +2°C and +8°C.

- **Control sera** They are supplied ready to use.
DO NOT DILUTE.

Preparation of the conjugate: Conjugate is ready to use and must be used adding 50µl/well.

DO NOT DILUTE

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add samples as indicated in point V. Add 50µl of controls in duplicate wells. Gently mix the content of the wells, seal the plate and incubate **over night (16 – 24 hours) at room temperature (20-25°C)**
3. Wash 3 times following the described procedure.
4. Add 50 µl of conjugate ready to use to each well. Seal the plate and incubate for **1h at room temperature (20-25°C)**
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 50 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature.**
7. Add 50 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

In case that the samples had been run in duplicate, it has to be considered the mean of both OD values. In the same way, you have to make the mean of the values obtained in the two wells of positive control and the two wells of negative control.

A. VALIDATION OF THE RESULTS

- The OD in the wells with Negative Control (NC) must be higher than 0.8.
- The OD in the wells with Positive Control (PC) must be lower than 0.35.

B. INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

IP of sample: $100 - [(sample\ OD / NC\ OD) \times 100]$

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific for WNV), when de IP is $\geq 40\%$

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for WNV in the sample) when the IP is $\leq 30\%$

Samples with IP between 30 and 40% should be considered **DOUBTFUL and retested by 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:

