



INGEZIM FVR IgM

Prod Ref: 13.FVR.K2

Ensayo inmunoenzimático de captura para la detección de IgM específica del virus del Valle del Rift en suero de rumiantes.

Capture immunoenzymatic assay for the detection of specific IgM antibodies to Rift Valley virus in ruminant serum.

Última revisión / Last review: 27-10-16
Nº de registro en España/Registration number in Spain: 3777 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 antigenadas con AcM específico de IgM de rumiante. Microtitration plates divided in strips coated with ruminant IgM-specific Mab.	2		5	
Viales Suero Control Positivo listo para su uso. Vials with Positive Control serum, ready to use.	1	2,5 ml	2	2,5 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso. Vials with Negative Control serum, ready to use.	1	2,5 ml	2	2,5 ml
Viales con antígeno FVR conjugado con peroxidasa listo para su uso. Vials with FVR antigen peroxidase conjugated, ready to use.	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 de suero (DE14-01). Bottles with serum diluent, ready to use (DE14-01).	1	60 ml	2	60 ml
Fascos conteniendo sustrato TMB. Bottles with substrate TMB.	1	30 ml	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado (Ácido Sulfúrico). Bottles with Stop Solution (Sulphuric acid).	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

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de captura cuyo fundamento se detalla a continuación.

Las placas se suministran tapizadas con un anticuerpo monoclonal (AcM) específico de IgM de rumiantes (oveja, cabra y vaca).

En cada pocillo se dispensan los sueros problema a valorar por duplicado. Los anticuerpos IgM presentes en el suero serán capturados por el AcM de la placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno de FVR conjugado con peroxidasa (en este caso la proteína N obtenida de forma

recombinante). En caso de una muestra positiva, este conjugado será capturado por las IgMs fijadas en el paso anterior en el pocillo. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, esta unión podrá detectarse mediante la adición de un sustrato adecuado. Los pocillos con sueros positivos, es decir, con anticuerpos IgM específicos, presentarán una reacción coloreada, proporcional al título o nivel de anticuerpos, mientras que en los pocillos donde se hayan ensayado sueros negativos, no aparecerá color.

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso.
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización. **¡MUY IMPORTANTE!**
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 de pipeta nueva por cada muestra a testar.
8. Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
9. 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.
10. 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:

Realizar una dilución 1/5 del suero en el diluyente. Esta dilución puede hacerse también directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 80µl de diluyente y luego 20µl de muestra.

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado 25x:**
Disolver una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40ml de solución concentrada más 960ml de agua destilada). Una vez preparada la solución, permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- **Diluyente:** Se presenta listo para su uso .No diluir.
- **Conjugado:** Se presenta listo para su uso. No diluir.
- **Controles:** Se presentan listos para su uso. No diluir.

VII. PROCEDIMIENTO

Antes de empezar el ensayo equilibrar los componentes del kit que se vayan a utilizar, a temperatura ambiente (20-25°C).

1. Incubación de los sueros:

- Añadir 80 µl de diluyente a cada pocillo excepto en los pocillos reservados a controles. A continuación añadir 20 µl de muestra por pocillo. Agitar suavemente para homogenizar.
- Añadir 100 µl de los controles sin diluir.
- Tapar la placa e incubar **1 hora a temperatura ambiente (20-25°C)**.

2. Lavar 4 veces según instrucciones anteriores.

3. Añadir 100 µl de conjugado en cada pocillo. Cubrir e incubar **30 min a temperatura ambiente (20-25°C)**.
4. Lavar 5 veces.
5. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **15 minutos a temperatura ambiente**.
6. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispensó la solución sustrato.
7. Leer inmediatamente a 450 nm de longitud de onda.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

La lectura se realiza a una longitud de onda de **450 nm**. Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas.

A. Validación del ensayo:

El kit se considerará válido cuando:

La Abs 450nm del Control (+) menos la Abs 450nm del Control (-) es mayor de 0.35 y además la absorbancia del control negativo es menor de 0.25

B. Cálculo del índice de positividad (M/P):

Para calcular el índice M/P realizar la siguiente operación

$$M/P = \frac{(Abs450 \text{ nm Muestra})}{(Abs 450nm C +)}$$

C. Puntos de corte

Se considera una muestra como positiva si su índice M/P es igual o superior a 0.4
Se considera una muestra como negativa si su índice M/P es menor de 0.40

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a capture enzymatic immunoassay. The technique is briefly described below:

A Monoclonal antibody (MAb) specific to ruminant IgMs is fixed on a solid support (polystyrene plate). The IgMs present in the samples will be captured by the MAb adsorbed on the plate. After a washing step to eliminate all non-fixed material from the serum sample, a viral antigen of the Rift Valley Virus (recombinant N protein), peroxidase conjugated, is added. If the serum sample contains specific

immunoglobulins M to FVR this viral conjugate will be captured.

After a washing step and adding the substrate a colorimetric reaction will develop, which can be measured by an ELISA reader.

The development of colour means that there are IgM antibodies against the virus present in the ruminant sera, whilst the absence of colour indicates the absence of these specific antibodies.

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. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
6. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
9. The stop solution is a strong acid and therefore must also be handled with care.
10. The substrate must be handled with care, as it is very sensitive 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 can be done using an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in 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 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.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

V. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be tested at 1/5 dilution in the serum diluent. This dilution can be made directly on the plate by adding 80µl of the diluent and 20µl of the sample to each well. Mix gently to homogenize the solution.

VI. PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution 25x:

Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water. (40ml of the concentrated solution in 960ml of distilled or deionised water). Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.

Preparation of the sera diluent

The diluent is ready to use. **Do not dilute**

Preparation of the control sera:

Controls are ready to use. Do not dilute.

Preparation of the viral antigen peroxidase conjugated:

The antigen is ready to use. Do not dilute.

VII. TEST PROCEDURE:

- Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (20-25°C) (except for the conjugate, which must be brought to RT right before its use).
- Incubation of serum samples:
 - Add 80 µl of the diluent to each well and then add 20µl of the serum to each well.
 - Homogenize the content of the wells by gently shaking the plate.
 - Add 100µl of the ready to use controls.
 - Seal the plate and **incubate for 1h at room temperature (20-25°C)**.
- Wash 4 following the procedure previously described.
- Add 100 µl of the conjugate to each well. Seal the plate and incubate for **30 min at room temperature (20-25°C)**.
- Wash 5 times following the procedure previously described.
- Add 100 µl of the substrate solution, to each well. Keep the plate for **15 min at room temperature**.
- Add 100 µl of the stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Validation of the test:

The test is considered valid when the OD of the positive control at 450 nm minus the OD of the negative control is higher than 0.25 and the OD of the negative control at 450 nm is lower than 0.25.

Interpretation of the results:

The S/P must be calculated as follows:

Samples with an S/P higher than or equal to 0.4 should be considered as **positive** to FVR IgM antibodies.

Samples with an S/P lower than 0.4 should be considered as **negative** to FVR IgM antibodies.

(Sample OD)

S/P = _____

(Positive Control OD)



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:



IT-73840
IT-73780
ISO 14001:2015
9191.INGE
ISO 9001:2015
9175.ING2