



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.

Version Doc:29.05.2024

Nº de registro en España: 3300-RD

Registration number in Spain: 3300-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas		10 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5		10	
Viales de Control Positivo	1	4mL	2	4mL	4	4mL
Viales de Control Negativo	1	4mL	2	4mL	4	4mL
Viales de Conjugado listo para usar (AcM anti proteína N-HRPO)	1	30mL	2	30mL	4	30mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Frascos conteniendo Sustrato (ABTS), listo para usar	1	30mL	1	60mL	2	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL	2	60mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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 50-250 mL.
Lector ELISA (filtro de 405 nm)

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 él 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.

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 y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. 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.
8. La solución de frenado conservada en refrigeración podría precipitar, en ese caso se puede calentar a 37°C hasta su completa disolución. La solución de frenado puede formar espumas. Evitar dispensar burbujas en la placa ya que podría afectar la lectura de los resultados.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C.
Los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos a -20°C.

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. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de NaOH 0,1M, ya que las muestras problema podrían contener agentes infectivos.
- Distribuir unos 300 µL de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el 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.

PREPARACIÓN DE LAS 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.

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 más 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.**

PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. **Adición de los sueros y controles:**
 - 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 (es recomendable poner los controles por duplicado).
 - Tapar la placa e **incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C).**
3. Lavar 4 veces el procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo. Tapar la placa e **incubar 30 minutos a temperatura ambiente.**
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. **Atención:** 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.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

VALIDACION DE RESULTADOS

- El valor de densidad óptica (DO 405 nm) del control negativo (CN) debe > 0,80
- El valor de densidad óptica (DO 405 nm) del control positivo (CP) ha de < 0,25

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

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

$$PI \text{ Muestra} = 100 - \left(\frac{DO \text{ Muestra}}{DO \text{ Control negativo}} \right) \times 100$$

- Muestras con $PI \geq 45\%$ serán consideradas como **positivas**.
- Muestras con $PI \leq 40\%$ se considerarán como **negativas**.
- Muestras con PI entre 40 y 45% se considerarán **dudosas y se recomienda analizarlas por seroneutralización (SN).**

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>		<i>10 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5		10	
Vials with Positive Control	1	4mL	2	4mL	4	4mL
Vials with Negative Control	1	4mL	2	4mL	4	4mL
Vials ready to use (MAb anti N protein- HRPO)	1	30mL	2	30mL	4	30mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	125mL	1	125mL	1	250mL
Bottles with Substrate (ABTS), ready to use	1	30mL	1	60mL	2	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL	2	60mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Distilled or deionized 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)

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.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used and never return the excess substrate to the bottle.
8. Stop solution can precipitate at refrigeration, in this case, incubate at 37°C before use, to eliminate the precipitation. The stop solution may form foams. Avoid dispensing bubbles on the plate as this may affect the reading of the results.

STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C.

Control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them in aliquots at -20°C.

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 turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
- 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. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

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.

PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution:

Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized 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.**

TEST PROCEDURE

1. Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (20°C to 25°C).
2. **Addition of sera control**
 - Add 80 µL of the diluent and then 20 µL of each sample in every well to be assayed. Add 100 µL of positive and negative controls to their respective wells. We recommend running controls in duplicate.
 - Seal the plate and **incubate 45 minutes at room temperature.**
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 room temperature.**
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.

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.

VALIDATION OF THE RESULTS:

The test is considered valid when:

- The OD of the Negative Control (NC) > 0.80
- The OD of the Positive Control (PC) < 0.25

INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

$$\text{IP of Sample} = 100 - \left(\frac{\text{Sample OD}}{\text{Negative control OD}} \right) \times 100$$

- 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.

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA
C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



Distribuido en
Distributed in

por
by