



INgezim® WEST NILE IgM

Prod Ref: 14.WNV.K2

Ensayo inmunoenzimático de captura para la detección de IgM específica del virus de West Nile en suero de caballo.

Capture immunoenzymatic assay for detection of West Nile IgM specific antibody in equine serum.

Version Doc:30.05.2024

Nº de registro en España: 2863-RD

Registration number in Spain: 2863-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

<i>REACTIVO</i>	<i>2 Placas</i>	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2	
Viales de Antígeno Positivo, listo para usar	1	5,5mL
Viales de Antígeno Negativo, listo para usar	1	5,5mL
Viales de Suero Control Negativo, listo para usar	1	2mL
Viales de Suero Control Positivo, listo para usar	1	2mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	12mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	65mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	60mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	15mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	15mL

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 450 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO 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 caballo.

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 positivo de West Nile (APWNV) en uno de los pocillos y antígeno negativo control (ANC) en el otro. El APWNV quedará unido al pocillo solo si el suero contenía IgM específicas del virus de West Nile. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá detectarse esta unión mediante la adición de un AcM conjugado específico del dominio III de la proteína E del virus de West Nile marcado con peroxidasa.

Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros 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 reacción coloreada.

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 es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°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

Todas las muestras deben ensayarse en dos pocillos diferentes. Se preparará cantidad suficiente para 2 pocillos por muestra. Realizar una dilución 1/5 del suero en el diluyente. Esta dilución puede hacerse también directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 40 µL de diluyente y luego 10 µL de muestra.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado 25x:

Disolver una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 mL de solución concentrada más 960 mL 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**

Antígeno positivo y antígeno negativo: Se presentan listo para su uso. **No diluir**

Conjugado: Se presenta listo para su uso. **No diluir**

Controles: Se presentan listos para su uso. **No diluir**

PROCEDIMIENTO

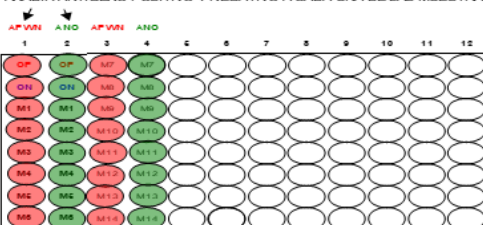
Antes de empezar el ensayo equilibrar los componentes del kit que se vayan a utilizar, a temperatura ambiente (+20°C y +25°C).

Atemperar el conjugado justo antes de su utilización.

1. Incubación de los sueros:

- Añadir 40 µL de diluyente a cada pocillo excepto en los pocillos reservados a controles. A continuación, añadir 10 µL de muestra por pocillo. **TODAS LAS MUESTRAS TIENEN QUE SER ENSAYADAS POR DUPLICADO.**
- Agitar suavemente para homogenizar.
- Añadir 50 µL de los controles sin diluir, también por duplicado (Ver ejemplo Fig 1).
- **Cubrir e incubar 1 hora a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C) en cámara húmeda.**
2. Lavar 3 veces según instrucciones anteriores.
3. Añadir 50 µL del antígeno positivo de West Nile (APWN-color rojo) sobre uno de los duplicados y 50 µL de antígeno negativo control (ANC-color verde) sobre el otro (ver ejemplo de Fig 1). **Sellar bien la placa e incubar de 16 a 24 horas a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C) en cámara húmeda.**
4. Lavar 5 veces según procedimiento indicado.
5. Añadir 50 µL de conjugado en todos los pocillos. **Cubrir e incubar 1 hora temperatura ambiente en cámara húmeda.**
6. Lavar 5 veces.
7. Añadir 50 µL de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción durante **15 minutos a temperatura ambiente.**
8. Añadir 50 µL de solución de frenado a cada pocillo. Añadirla en el mismo orden en que se dispuso la solución sustrato.
9. Leer inmediatamente a 450 nm de longitud de onda.

1. PA 50 AÑADIR MUESTRAS POR DUPLICADO
2. PA 50 AÑADIR ANTIGENO POSITIVO Y NEGATIVO A CADA UNA DE LAS MUESTRAS



APWN: Antígeno positivo West Nile
ANC: Antígeno negativo control

CN: control negativo
CP: Control positivo

M1: Muestra 1 por duplicado en pocillos C1 y C2
M2: Muestra 2 por duplicado en pocillos D1 y D2

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realiza a una longitud de onda de **450 nm**.

En todos los casos (controles y muestras) se restará la absorbancia obtenida con el antígeno negativo de la obtenida con el antígeno positivo.

VALIDACIÓN DEL TEST:

El test se considerará válido cuando la DO corregida (DOc):

- DOc Control Positivo (Abs AgPOS - Abs AgNEG) > 0,8
- DOc Control Negativo (Abs AgPOS - Abs AgNEG) < 0,25

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Muestras positivas y negativas

Las muestras se considerarán positivas (presentan anticuerpos IgM frente a WNV), cuando:

- $DO_{cm} = (\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG}) \geq 0,35$

Las muestras se considerarán negativas (no presentan anticuerpos IgM frente a WNVV), cuando:

- $DO_{cm} = (\text{Abs Ag POS} - \text{Abs Ag NEG}) \leq 0,30$

Muestras comprometidas

Las muestras que presenten valores de DO_{cm} entre 0,3 y 0,35, en la que podría denominarse "Zona Gris", se recomienda que se repitan. Si la muestra repetida se mantiene en la zona gris recomendamos se ensaye una nueva muestra de una segunda extracción de sangre, tomada alrededor de 15 días después de realizada la primera.

Todas las muestras positivas y comprometidas deberán confirmarse por seroneutralización.

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>	
	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2	
Vials with Positive Antigen, ready to use	1	5,5mL
Vials with Negative Antigen, ready to use	1	5,5mL
Vials with Negative Control Sera, ready to use	1	2mL
Vials with Positive Control Sera, ready to use	1	2mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	12mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	65mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	60mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	15mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	15mL

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 (450 nm filter)

TECHNICAL BASIS

This kit is based on a capture enzymatic immunoassay. We make a brief description of the technique below:
A Monoclonal antibody (MAb) specific of equine IgM is fixed on a solid support (polystyrene plate). Samples are placed in two wells of microplates. If sample contains IgM antibodies, they will be captured by the MAb adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non fixed material from serum sample, viral antigen of West Nile Virus (WNVAP) should be added to 1 well and Control Negative Antigen (CNA) to the second well. If serum sample contains specific immunoglobulins M to WNV they will be captured.
After additional washing peroxidase-conjugated Mab specific to WNV E protein (domain III) should be added. After washing and addition of the substrate a colorimetric reaction will be developed which can be measured by an ELISA reader.
In this way presence of colour means presence of antibodies IgM against the virus in equine sera, and absence of colour, absence of specific IgM antibodies.

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 is a strong acid solution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.

STORAGE OF COMPONENTS

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

Samples must be tested in two wells. Enough quantity for two wells should be prepared. Sera samples must be tested at dilution 1/5 in serum diluent. This dilution can be made on the assay plate directly by adding 40 µL of diluent and 10 µL of sample to each well. Mix gently to homogenate the solution.

PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution 25x:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit into 24 parts of distilled or deionized water. (40 mL of the concentrated solution in 960 mL of distilled or deionized water) When ready this solution remains stable when is stored between +2°C and +8°C.

Preparation of the sera diluent

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 and the control antigen:

Antigens are ready to use. **Do not dilute.**

Preparation of the conjugate

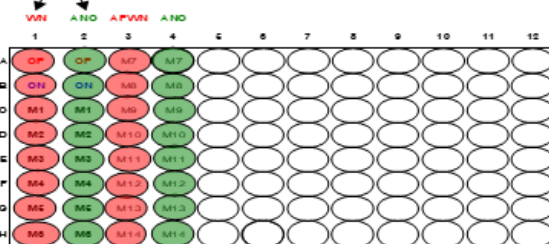
Conjugate is ready to use. **Do not dilute.**

TEST PROCEDURE

- It is recommended to bring the reagents to be used to RT (20°C to 25°C). Let the conjugate reaches the RT just before be used.
- Incubation of serum samples: ALL THE SAMPLES MUST BE RUN BY DUPLICATE. (see Figure 1)
 - Add 40 µL of diluent to each well and then add 10 µL of the serum to each well (two wells per sample).
 - Homogenize content of wells by gentle shaking of the plate.
 - Add 50 µL of controls ready to use (two wells per control).
 - Seal the plate and incubate for **1h at room temperature (20°C to 25°C) in a moist chamber.**
- Wash 3 times following the previously described procedure.
- Dispense 50 µL of WNV positive antigen (APWNV red colour) in the well containing the first duplicate, and 50 µL of negative antigen control (ANC green colour) in the well containing the second duplicate. (see Figure 1)
- Seal the plate and **incubate for 16-24h at room temperature in a moist chamber.**
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 50 µL of conjugate to each well. Seal the plate and **incubate for 1h at room temperature in a moist chamber.**
- Wash 5 times following the described procedure.
- Add 50 µL of substrate solution, to each well. Keep the plate for 15 min at room temperature.
- Add 50 µL of stop solution to each well.
- Read the OD with an ELISA reader at 450 nm (within 5 min after stopped).

1. STEP Run the samples by duplicate

2. STEP Add positive antigen and negative antigen to each sample



APWNV: Positive Antigen to WNV
ANC: Negative Antigen control

CN: Negative Control
CP: Positive Control

M1: Sample 1 by duplicate in wells C1 & C2
M2: Sample 2 by duplicate in wells D1 & D2

READING AND RESULT INTERPRETATION

The reading must be done with a spectrophotometer at **450 nm**.

The OD obtained with negative antigen must be subtracted from the OD obtained with positive antigen (sample and controls)

VALIDATION CRITERIA:

The test will be considered valid when Corrected OD (ODc)

- ODc Positive Control (OD POS Ag - OD NEG Ag) > 0.8
- ODc Negative Control (OD POS Ag - OD NEG Ag) < 0.25

RESULTS INTERPRETATION:

Positive and negative samples

Sample should be considered positive for IgM antibodies to WNV when:

- **ODcm: (OD POS Ag - OD NEG Ag) $\geq$ 0.35**

Sample should be considered negative for IgM antibodies to WNV when:

- **ODcm: (OD POS Ag - OD NEG Ag) $\leq$ 0.30**

Doubtful samples

Samples showing values between 0.30 and 0.35 ("Grey zone") should be considered doubtful and retested. If the result is the same we recommend to assay a new extraction taken off 15 days after the first one.

All positive and doubtful (grey zone) samples must be confirmed by seroneutralization.

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



CERTIFIED

MANAGEMENT SYSTEM
QUALITY - ISO 9001
ENVIRONMENTAL - ISO 14001

9191.INGE

9175.INGE

Distribuido en

Distributed in

por

by