



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.

Version Doc:27.05.2024

Nº de registro en España: 1815-RD

Registration number in Spain: 1815-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5	
Viales de Control Positivo, listo para usar	1	1,25mL	2	1,25mL
Viales de Control Negativo, listo para usar	1	1,25mL	2	1,25mL
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	15mL	2	15mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE01-01), listo para usar	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	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 450 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO 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 de 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.

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

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.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Controles:

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

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).

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

Preparación del conjugado:

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

PROCEDIMIENTO

1. Equilibrar los componentes del kit a temperatura ambiente (entre +20°C y +25°C) antes de usar.
2. **Adición de los sueros y controles:**
 - Añadir 50 µL de los sueros diluidos según apartado “Preparación de las muestras”. 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 **1 h 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. **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 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

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 450 nm 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.

VALIDACIÓN DE RESULTADOS

- El valor de densidad óptica (DO 450 nm) del control negativo (CN) debe ser > 0,8.
- El valor de densidad óptica (DO 450 nm) del control positivo (CP) ha de ser < 0,35.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

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

- Muestras con $PI \geq 40\%$ serán consideradas como **positivas**.
- Muestras con $PI \leq 30\%$ se considerarán como **negativas**.
- Muestras con PI entre 30 y 40% se considerarán **dudosas** y se recomienda analizarlas por seroneutralización (SN).

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials with Positive Control, ready to use	1	1,25mL	2	1,25mL
Vials with Negative Control, ready to use	1	1,25mL	2	1,25mL
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	15mL	2	15mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Diluent (DE01-01), ready to use	1	125mL	1	125mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	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 (450 nm filter)

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.

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

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.

PREPARATION OF REAGENTS

Washing solution:

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 mL of the concentrated solution in 960 mL of distilled or deionized 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 50 µL/well. **Do not dilute.**

TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add samples as indicated in section "Preparation of Samples". Add 50 µL of controls in duplicate wells. Gently mix the content of the wells, seal the plate and incubate overnight (**16-24 hours**) at **room temperature (20°C to 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.**
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.

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.

VALIDATION OF THE RESULTS:

- The OD in the wells with Negative Control (NC) must be > 0.8
- The OD in the wells with Positive Control (PC) must be < 0.35

INTERPRETATION OF THE RESULTS:

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

$$\text{IP of sample} = 100 - \left(\left[\frac{\text{Sample OD}}{\text{NC OD}} \right] \times 100 \right)$$

- Samples will be considered **positive** (there are antibodies specific for WNV), when the IP is ≥ 40%
- Samples will be considered **negative** (there are no antibodies specific for WNV in the sample) when the IP is ≤ 30%
- Samples with IP between 30% and 40% should be considered **doubtful** and retested by 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



CERTIFIED

MANAGEMENT SYSTEM
QUALITY - ISO 9001
ENVIRONMENTAL - ISO 14001

9191.INGE

9175.INGE

Distribuido en

Distributed in

por

by