

Instructions for Use

West Nile IgM Capture ELISA

IVD

CE

REF EIA-4504

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Table of Contents / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	2
2	SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	2
4	MATERIALS SUPPLIED	2
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	4
6	PRECAUTIONS	4
7	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
8	TEST PROCEDURE	5
9	QUALITY CONTROL	9
10	CALCULATIONS.....	10
11	EXPECTED VALUES.....	11
12	LIMITATIONS.....	12
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	12
1	USO INTESO	16
2	RIASSUNTO E SPIEGAZIOEN DEL TEST.....	16
3	PRINCIPIO DEL TEST	16
4	MATERIALIE FORNITO.....	16
5	MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO	18
6	PRECAUZIONI.....	18
7	RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE.....	19
8	PROCEDIEMNTO DEL TEST	19
9	CONTROLLO QUALITÀ.....	23
10	CALCOLO	24
11	VALORI ASPETTATI.....	25
12	LIMITI	26
13	CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO	26
14	REFERENCES / LITERATURE / BIBLIOGRAFIA.....	29
15	TROUBLESHOOTING	30
	SYMBOLS USED	31

1 INTENDED USE

The West Nile IgM Capture ELISA is designed for the qualitative detection of IgM antibodies to West Nile recombinant antigens (WNRA) in human serum.

This test is intended for use for the presumptive clinical laboratory diagnosis of West Nile virus infection in patients with clinical symptoms consistent with meningoencephalitis. Positive results must be confirmed by Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT), or by using the current CDC guidelines for diagnosis of this disease.

Assay performance characteristics have not been established for testing cord blood, neonate, prenatal screening, general population screening without symptoms of meningoencephalitis or automated instruments. This assay is not FDA cleared or approved for testing blood or plasma donors.

Caution:

IgM assay cross-reactivity has been noted with some West Nile IgM assays testing specimens containing antibody to enteroviruses. Reactive results reported from children must contain a caution statement regarding possible cross-reactivity with enteroviruses.

2 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Exposure to West Nile Virus causes a disease with a number of symptoms including encephalitis. West Nile virus (WNV) is a potentially neuroinvasive agent that causes asymptomatic infection and fevers in humans.

Human and animal infections were not documented in the Western Hemisphere until the 1999 outbreak in the New York City metropolitan area (1,2). Since then, the disease has spread across the United States. In 2003, WNV activity occurred in 46 states and caused illness in over 9,800 people.

Most WNV infected humans usually have no symptoms. A small proportion develops mild symptoms that include fever, headache, body aches, skin rash and swollen lymph glands. Clinically, WNV fever in humans is a self-limited acute febrile illness accompanied by headache, myalgia, polyarthropathy, rash, gastrointestinal symptoms, and lymphadenopathy (3, 4).

Less than 1% of infected people develop more severe illness that includes meningitis or encephalitis (5, 6).

The West Nile IgM Capture ELISA employs a recombinant WNV antigen called WNRA, which can be used as a rapid serological marker for WNV infection. The WNRA protein is a recombinant antigen, which consists of a stretch of sequences from two WNV antigens (encoded by prM-E gene).

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The West Nile IgM Capture ELISA consists of one enzymatically amplified "two-step" sandwich-type immunoassay.

In this assay, controls and unknown serum samples are incubated in microtiter wells which have been coated with anti-human IgM antibodies. The serum samples may be directly mixed with sample dilution buffer for WN IgM, then added in the wells. This is followed by incubation with the West Nile Virus derived recombinant WNRA protein and a control preparation (NCA) separately. After one hour incubation and washing, the wells are treated with a WNRA-specific antibody labeled with the enzyme horseradish peroxidase (HRP).

After a second incubation and washing step, the wells are incubated with the tetramethylbenzidine (TMB) substrate. An acidic stopping solution is then added and the degree of enzymatic turnover of the substrate is determined by absorbance measurement at 450 nanometers.

Above a certain threshold, the ratio of the absorbance of the WNRA and the control wells prescriptively determines whether antibodies to WNV are present.

A set of positive and negative controls is provided in order to monitor the integrity of the kit components.

4 MATERIALS SUPPLIED

The West Nile IgM Capture ELISA Kit contains sufficient reagents for one plate of 96 wells (12 x 8 strips) each. Warning: Do not use any reagents where damage to the packaging has occurred.

The kit contains the following reagents:

1. Coated **Microtiter Strips** for Human IgM
96 polystyrene microtiter wells (12 x 8 strips).
Coated with goat anti-human IgM antibody in each well.
Ready to use. Stable at 2 °C - 8 °C until the expiration date.

2. Sample Dilution Buffer for WN IgM

One bottle (25 mL). Ready to use.

Phosphate Buffered Saline (pH 7.2 - 7.6) with Tween 20, preservative (0.01% thimerosal) and additives.

Use for the dilution of test samples, positive and negative controls.

Stable at -70 °C until the expiration date.

Note:

For quick thaw, place the bottle containing Sample Dilution Buffer in a container with clean water maintained at room temperature (just immerse up to the height of the content). Following complete thaw, take out the bottle, remove excess water on exterior with clean paper towels. *If any precipitate is seen after the thaw process, vortex the tube very well to obtain a homogeneous solution before use.*

3. WN Human IgM Positive Control

One vial (50 µL). Heat-inactivated positive serum containing 0.01% thimerosal.

The WN IgM positive control will aid in monitoring the integrity of the kit as well.

Stable at -70 °C until the expiration date. Before use, quickly centrifuge the vials so that contents can be collected at the bottom.

Note: For long-term storage, serum should be further aliquoted in smaller volumes and stored at -70 °C.

4. WN Human IgM Negative Control

One vial (50 µL). Heat-inactivated negative serum.

The negative control will aid in monitoring the integrity of the kit as well.

It is stable at -70 °C until the expiration date.

Before use, quickly centrifuge the vials so that contents can be collected at the bottom.

Note: For long-term storage, serum should be aliquoted in smaller volumes and stored at -70 °C.

5. West Nile Antigen (WNRA) for IgM

One tube (5 mL). Ready to use.

Contains Tween 20, preservative (0.002-0.005% Thimerosal), antibiotics (0.0025 - 0.004% G418 sulphate), WNV antigens (Non-infectious WNV PrM and E antigens) and additives.

Stable at -70 °C until the expiration date.

Caution: The WNRA should not be repeatedly frozen and thawed. It should be aliquoted in a smaller volume and frozen at -70 °C.

6. Ready to Use Normal cell antigen (NCA) for WN IgM

One tube (5 mL). Ready to use.

Contains Tween 20, preservative (0.002-0.005% Thimerosal), culture supernatant of COS-1 cell line and additives.

Stable at -70 °C until the expiration date.

Caution: To avoid repetitive freezing and thawing, the sample should be aliquoted and stored at -70 °C.

7. Ready to Use Enzyme Conjugate-HRP for WN IgM

One bottle (9 mL). Ready to use.

Contains 6B6C-1 mAb (to WN virus E protein antigen) conjugated with horseradish peroxidase in phosphate buffered saline (pH 7.2 - 7.6) with Tween 20, preservative (0.01% thimerosal) and additives.

Stable at 2 °C - 8 °C until the expiration date.

8. 10X Wash Buffer

One bottle (120 mL). 10X concentrate of phosphate buffered saline with Tween 20, pH 6.7 - 7.1.

Stable 2 °C - 8 °C until the expiration date.

Note: See Preparation of Reagents in Test procedure section to prepare 1X Wash Buffer.

9. EnWash:

One bottle (20 mL). Ready to use.

Phosphate buffered saline with Tween 20, pH 7.2 - 7.6.

Stable at 2 °C - 8 °C until the expiration date.

10. Liquid TMB Substrate

One bottle (12 mL). Ready to use.

Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide in a citric-acid citrate buffer (pH 3.3 - 3.8).

Stable at 2 °C - 8 °C until the expiration date.

Note: The substrate should always be stored in the light-protected bottle provided.

11. Stop Solution

One bottle (9 mL). Ready to use.

1N Sulfuric Acid. Used to stop the reaction.

Stable at 2 °C - 8 °C until the expiration date.

Caution: strong acid, wear protective gloves, mask and safety glasses. Dispose of all materials according to safety rules and regulations.

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- ELISA Spectrophotometer
- Measurement at 450 nm
- Biological or High-Grade Water
- Vacuum Pump
- 37 °C incubator without CO₂ supply. **Note:** Do not use a humidified chamber.
- Plate washer
- Polypropylene Tubes
- Multipipettors and tips
- Parafilm
- Timer
- Vortex

6 PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

6.1 Lab Precautions

- Wear protective clothing, eye protection and disposable gloves while performing the assay. Wash hands thoroughly afterwards.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic materials are being handled.
- Do not pipette by mouth.
- Cover working area with disposable absorbent paper.
- Using humidified chambers instead of incubators for the 37 °C incubation step may invalidate the results of the test.

6.2 Test Sera Precautions

- All human source materials used in the preparation of controls have tested negative for antibodies to Human Immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV) as well as Hepatitis B surface antigen. However no test method can ensure 100% efficiency, thus, all human controls and antigen should be handled as potentially infectious materials. The Center for Disease Control and the National Institute of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- This test must be performed on serum only. The use of whole blood, plasma or other specimen matrix has not been established.
- Icteric or lipemic sera, or sera exhibiting hemolysis or microbial growth must not be used.
- Do not heat- inactivate sera.

6.3 Reagent Precautions

- Avoid exposure of the reagents to excessive heat or direct sunlight during storage and incubation.
- Do not use any component beyond the expiration date shown on its label.
- Do not mix lots of any kit component within an individual assay microtiter plate.
- Some reagents may form a slight precipitate, mix gently before use.
- Unused microwells must be resealed immediately and stored in the presence of desiccant. Failure to do this may cause erroneous results.
- The ready-to-use conjugate is very susceptible to bacterial contamination, which will affect performance. Keep lid on when not in use and dispense with sterile pipets.
- Substrate System:
 - (a) Avoid prolonged exposure to direct light.
 - (b) TMB is susceptible to contamination from metal ions, do not allow the substrate system to come into contact with metal surfaces
 - (c) Avoid contamination of TMB with conjugate.
 - (d) Some detergents may interfere with the performance of the TMB thus, it is imperative to accurately follow plate washing directions.
 - (e) The TMB may have a faint blue color. This will not affect the activity of the substrate or the results of the assay.

6.4 Testing Precautions

- All reagents must be equilibrated to room temperature (20 °C - 25 °C) before commencing the assay. The assay will be affected by temperature changes.
- Avoid repeated freezing and thawing cycles of the reagents supplied in the kit and of specimens.

- **To avoid sample contamination, a fresh pipettor tip must be used to dispense each control and test sera.**
- Dispense reagents directly from bottles using clean pipette tips or sterile pipets.
- Incomplete washing will adversely affect the outcome and assay precision.
- To minimize potential assay drift due to variation in the substrate incubation time, care should be taken to add the stopping solution into the wells in the same order and speed used to add the TMB solution.
- Do not subtract blank well readings.

WARNING:**POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL**

This kit contains reagents made with human serum or plasma. The serum or plasma used has been heat inactivated unless otherwise stated. Handle all sera and kits used as if they contain infectious agents. Observe established precautions against microbiological hazards while performing all procedures and follow the standard procedures for proper disposal of specimens.

CHEMICAL HAZARD:

Safety Data Sheets (SDS) are available for all components of this kit. SDS sheets are available upon request. Review all appropriate SDS before performing this assay. Avoid all contact between hands and eyes or mucous membranes during testing. If contact does occur, consult the applicable SDS for appropriate treatment.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Blood obtained by venipuncture should be allowed to clot at room temperature (20 °C - 25 °C) for 30 to 60 minutes and then centrifuged according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷

(GP44: Procedure for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline).

- Only Human serum can be used with this assay. Whole blood or plasma cannot be used.
- Remove serum from the clot of red cells as soon as possible to avoid hemolysis.
- Testing should be performed as soon as possible after collection. Do not leave sera at room temperature for prolonged periods.
- Serum should be used and the usual precautions for venipuncture should be observed. The samples may be stored at 2 °C - 8 °C for up to 48 hours or frozen at -70 °C or lower for up to 30 days. To maintain long-term longevity of the serum, store at -70 °C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.
- Do not use hemolyzed or lipemic samples.
- Frozen samples should be thawed to room temperature and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.
- If sera are shipped, pack in compliance with Federal Regulations covering transportation of infectious agents.

8 TEST PROCEDURE**CAUTION:**

The test procedure must be adhered to. Any deviations from the procedure may produce erroneous results.

This kit has not been optimized by DRG for use with any particular automated ELISA processing system. Use with an automated ELISA processing system will require proper validation to ensure results are equivalent to the expectations described in this package insert. Modifications to the protocol of these systems and/or different volumes of reagents may be required.

Bring all kit reagents and specimens to room temperature (20 °C ~ 25 °C) before use. Thoroughly mix the reagents and samples before use by gentle inversion.

Note: For long-term storage, all serum, including the experimental, cannot be repeatedly thawed and frozen. Sera should be further aliquoted in a smaller volume and stored at -70 °C.

8.1 Preparation of Reagents**Preparation of 1X Wash Buffer**

Dilute the 10X Wash Buffer to 1X using Biological or High-Grade Water.

The bottle contains 120 mL of 10X Wash Buffer. Mix 120 mL of 10X Wash Buffer with 1080 mL of biological or High-Grade Water to make 1X Wash Buffer.

After diluting to 1X, store at room temperature for a maximum of four months.

Note: Discard the 1X Wash Buffer if you see any microbial growth.

Microtitration Wells

Select the number of coated wells required for the assay. The remaining unused wells should be covered and immediately returned to the foil pouch with desiccant on top of the plate, resealed and stored at 2 °C - 8 °C until ready to use or expiration.

8.2 Assay Procedure

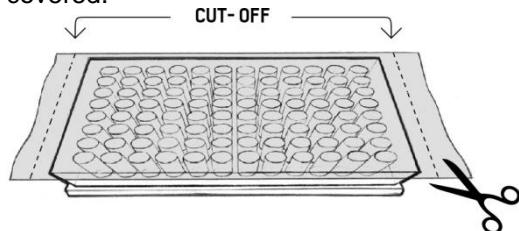
1. Positive, negative, and unknown serum to be tested should be assayed in duplicate. Refer to flow chart at the end of this section for illustration of this procedure. Twenty-two test specimens can be tested on one 96 well plate.
2. Mark the microtitration strips to be used.
3. Dilute test sera and the controls to **1/100** using the provided Sample Dilution Buffer for WN IgM (SD). (You may use small polypropylene tubes, multi-well untreated plastic strips, or plates for these dilutions and use at least 4 µL of unknown serum samples, positive, and negative controls. For example, 4 µL serum plus 396 µL of Sample Dilution Buffer for WN IgM to make 1/100 dilution.)
4. Apply the 50 µL/well of 1/100 diluted test sera, and controls to the plate by appropriate pipette. An exemplary arrangement for twenty-two test serum samples in duplicate is shown below.

Note: samples and controls are to be assayed with WNRA and NCA.

Example for sera application

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
B	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
C	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
D	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
E	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
F	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
G	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
H	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21

5. Cover the plate with parafilm or plate covers just on the well opening surface, so the bottom of the plates is not covered.

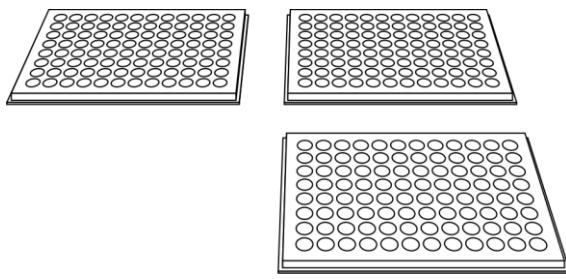


Note: This is to make sure the temperature distribution is evenly spread out in all wells from bottom and sides; once the top is sealed to block evaporation, any extra parafilm should be cut off.

6. Incubate the plate at 37 °C for 1 hour in a non-humidified incubator.

Note:

Do not stack plates on top of each other. They should be spread out as a single layer. This is very important for even temperature distribution. Do not use CO₂, or any other gases used for tissue culture work.



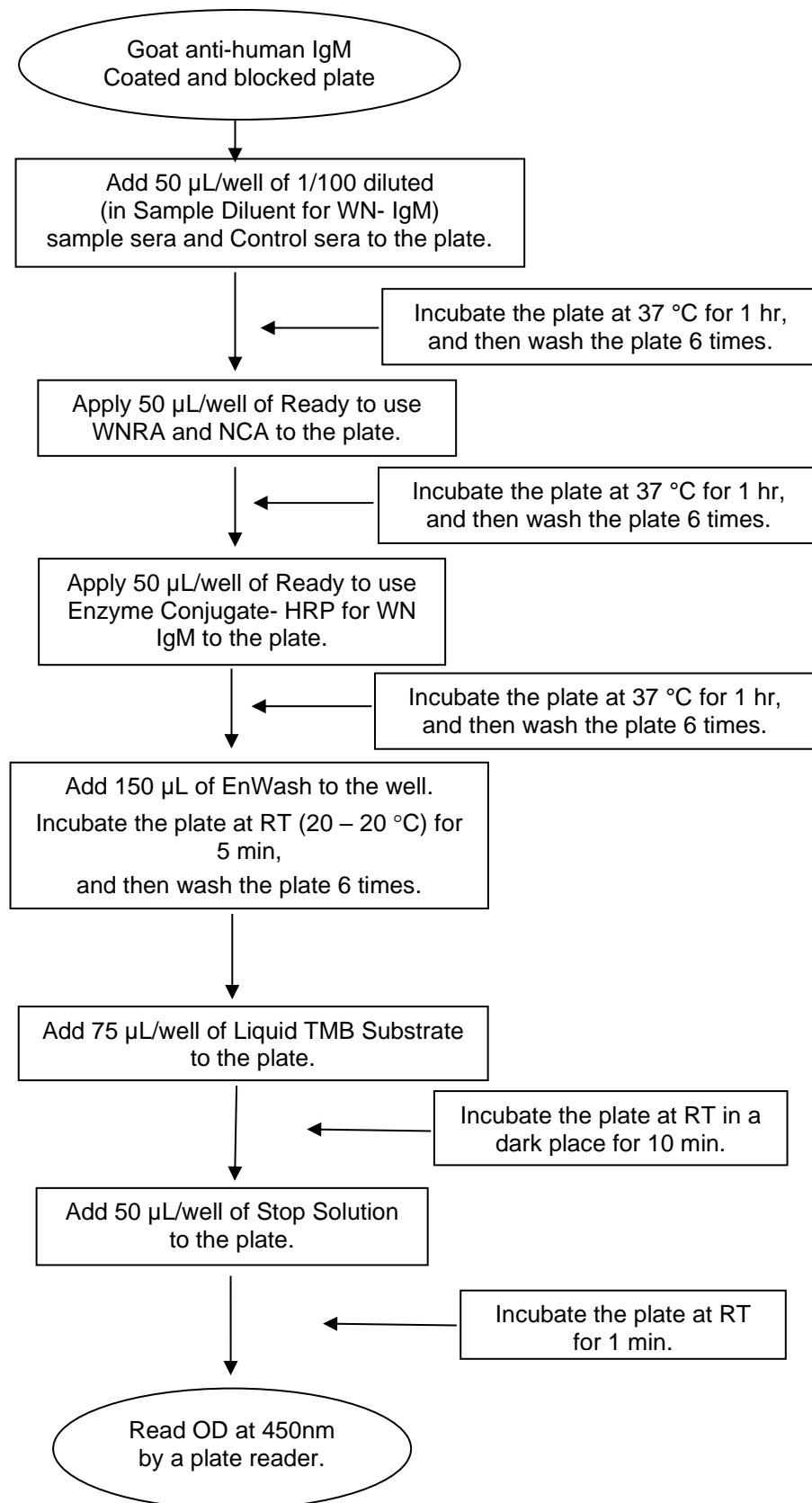
7. After the incubation, wash the plate 6 times with automatic plate washer using 1X Wash buffer. Use 300 µL /well in each wash cycle.
8. Add 50 µL per well of WNRA into row A-D and 50 µL /well of NCA into row E-H by multipipette. An exemplary application for WNRA and NCA is shown below.

Example for WN Antigens Application

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WN RA											
B	WN RA											
C	WN RA											
D	WN RA											
E	NCA											
F	NCA											
G	NCA											
H	NCA											

9. Cover the plate with parafilm just on the well opening surface, so the bottom of the plate is not covered. (as described in step 5)
10. Incubate the plate at 37 °C for 1 hour in a non-humidified incubator.
11. After the incubation, wash the plate 6 times with automatic plate washer using 1X Wash buffer. Use 300 µL /well in each wash cycle.
12. Add 50 µL /well of ready to use Enzyme-HRP conjugate into all wells by multi-pipettor.
13. Cover the plate with parafilm just on the well opening surface, so the bottom of the plate is not covered. (as described in step 5)
14. Incubate the plate at 37 °C for 1 hour in a non-humidified incubator.
15. After the incubation, wash the plate 6 times with automatic plate washer using 1X wash buffer. Use 300 µL /well in each wash cycle.
16. Add 150 µL/well of EnWash into all wells by a multi-channel pipette.
17. Incubate the plate at room temperature (20 °C - 25 °C) for 5 minutes. Do not cover the plate.
18. Wash the plate 6 times with automatic plate washer using 1X wash buffer. Use 300 µL /well in each wash cycle.
19. Add 75 µL /well of Liquid TMB substrate into all wells by multi-channel pipettor.
20. Place and incubate the plate at room temperature (20 °C - 25 °C) in a dark place (or container) for 10 minutes without any cover on the plate.
21. After the incubation, add 50 µL / well of Stop Solution into all wells by multi-channel pipettor and incubate at room temperature (20 °C - 25 °C) for 1 minute. Do not cover the plate.
22. After the incubation, read the OD 450 value with a Microplate reader.

FOR ACCURATE RESULTS, DO NOT SUBTRACT BLANK READINGS.

West Nile IgM Capture ELISA Flow Chart

9 QUALITY CONTROL

Each kit contains positive and negative control sera. Acceptable Immune Status Ratio (ISR) values for these controls are found on the specification table below. The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cutoff. The test is invalid and must be repeated if the ISR value of either of the controls does not meet the specifications. If the test is invalid, patient results cannot be reported. Quality control requirements must be performed in conformance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to CLSI C24 and 42 CFR 493.1256 for guidance on appropriate QC practices. The results below are given strictly for guidance purposes only and are applicable solely for spectrophotometric readings. Note: Do not subtract the "blank" from the OD readings.

Calculation of the Negative Control:

Calculate the mean Negative Control values with WNRA and with the Control antigen:

Example: Negative Control (NC)

	OD	
	WNRA	NCA
No. 1	0.085	0.076
No. 2	0.075	0.060
Total	0.160	0.136

$$\text{Averages (WNRA)} = 0.160 \div 2 = 0.080$$

$$(\text{NCA}) = 0.136 \div 2 = 0.068$$

$$\text{Compute the WNRA/NCA ratio: } 0.080 \div 0.068 = 1.18$$

Any Negative Control WNRA/NCA ratio greater than 4.47 indicates that the test is invalid and the assay must be repeated.

Calculation of the Positive Control:

Calculate Positive Control values with WNRA and with the NCA.

Example: Positive Control (PC)

	OD	
	WNRA	NCA
No 1	0.935	0.090
No 2	0.955	0.078
Total	1.890	0.168

$$\text{Averages (WNRA)} = 1.890 \div 2 = 0.945$$

$$(\text{NCA}) = 0.168 \div 2 = 0.084$$

$$\text{Calculate the WNRA/NCA ratio: } 0.945 \div 0.084 = 11.3$$

Any Positive Control WNRA/NCA ratio less than 5.66 indicates that the test is invalid and the assay must be repeated.

The results in the table below must be obtained in order that the results of the assay may be reported. Non-fulfillment of these criteria is an indication of deterioration of reagents or an error in the test procedure and the assay must be repeated.

Factor	Tolerance
Mean Negative Control (NC) OD in WNRA	< 0.300
Mean Positive Control (PC) OD in WNRA	> 0.500
PC Immune Status Ratio (ISR)	> 5.66
NC Immune Status Ratio (ISR)	< 4.47

10 CALCULATIONS

Calculation of the Immune Status Ratio (ISR):

Compute the average of the sample replicates with the WNRA, the sample replicates with the NCA, and then calculate the WNRA/NCA ratio (ISR) for all unknown samples the same way calculations were performed for the positive and negative controls.

Calculation of the ISR values for the test sera:

Calculate the mean serum ISR values:

Example: Test Serum #1

	OD	
	WNRA	NCA
No. 1	0.195	0.066
No. 2	0.205	0.070
Total	0.400	0.136

Averages (WNRA) = $0.400 / 2 = 0.200$ (NCA) = $0.136 / 2 = 0.068$

Compute the WNRA/NCA ratio: $0.200 / 0.068 = 2.94$

Any serum WNRA/NCA ratio less than 4.47 indicates no detectable IgM antibody is present. See interpretation of results section.

Example: Test Serum #2

	OD	
	WNRA	NCA
No. 1	0.695	0.085
No. 2	0.725	0.100
Total	1.420	0.185

Averages (WNRA) = $1.42 / 2 = 0.71$ (NCA) = $0.185 / 2 = 0.0925$

Compute the WNRA/NCA ratio: $0.710 / 0.0925 = 7.68$

Any serum WNRA/NCA ratio greater than 5.66 indicates presence of detectable WN IgM antibody. See interpretation of results section.

Example: Test Serum #3

	OD	
	WNRA	NCA
No. 1	0.310	0.065
No. 2	0.295	0.070
Total	0.605	0.135

Averages (WNRA) = $0.605 / 2 = 0.3025$ (NCA) = $0.135 / 2 = 0.0675$

Compute the WNRA/NCA ratio: $0.3025 / 0.0675 = 4.48$

Any serum WNRA/NCA ratio greater than 4.47 but less than 5.66 is an equivocal result and no conclusion can be made. See interpretation of results section.

Selection of the Cut-off:

The cut-off was selected using sera from an endemic population in the United States. The 282 samples consisted of 163 positive samples and 119 negative samples characterized by the CDC IgM Antibody Capture ELISA. The cut-off was determined by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis.

Interpretation of Results:

The West Nile Detect IgM Capture ELISA determines the presence of IgM antibodies to WN virus in serum of patients with clinical symptoms of meningoencephalitis. A positive result is indicative of presumptive WNV meningoencephalitis. The table below shows how the results should be interpreted.

ISR	Result	Interpretation
< 4.47	Negative	No detectable IgM antibody, individual does not appear to be infected with WN virus. The result does not rule out WN virus infection. An additional sample should be tested within 7-14 days if early infection is suspected. Other WN virus assays should be performed to rule out acute infection. Refer to the current CDC guidelines for diagnosis of this disease ¹ .
4.47 – 5.66	Equivocal	Equivocal samples should be repeated in duplicate. If both duplicates are above or below the cut-off the specimens may be reported as positive or negative respectively. Samples that remain equivocal after repeat testing should be reported, that WN virus IgM antibody cannot be determined, and repeated by an alternative method or another sample should be collected.
> 5.66	Positive	Presence of detectable IgM antibody, presumptive infection with WN virus. The result must be confirmed by plaque reduction neutralization test (PRNT), or alternatively, consult the current CDC guidelines for diagnosis of this disease ¹ . A positive IgM result may not indicate a recent infection. IgM antibodies to WN virus have been shown to persist for more than 500 days ⁶. Serological cross-reactivity across the flavivirus group is common (i.e. between Saint Louis encephalitis; dengue serotypes 1, 2, 3 and 4; Murray Valley encephalitis; Japanese encephalitis; and yellow fever viruses). Additionally, cross-reactivity has been noted with some West Nile virus assays to enteroviruses. Reactive results reported for children must contain a caution statement regarding possible cross-reactivity with enterovirus. These diseases must be excluded before confirmation of diagnosis.

The following is a recommended method for reporting the results obtained:

"The following results were obtained with the DRG West Nile IgM Capture ELISA. Values obtained with other assays may not be used interchangeably. The magnitude of the measured result, above the cut-off, is not indicative of the total amount of antibody present." The result should be reported as positive, negative or equivocal, and not as a numeric value. The reported results should contain an appropriate interpretation.

11 EXPECTED VALUES

West Nile virus infection is generally recognized by the presence of IgM antibodies within one week from the beginning of symptoms. Detectable levels of IgM may be low in early infection.

Two hundred samples were prospectively collected from Florida, Texas and Pennsylvania during March 2004.

The distribution of females was 50% (100/200) and males were 50% (100/200). The data in Table 1 illustrates the prevalence of IgM antibodies in different age groups when using the West Nile IgM Capture ELISA Test.

Of the 200 normal sera, one was positive and one was equivocal. The latter specimen was repeated in duplicate and remained equivocal on the West Nile IgM Capture ELISA Test. The positive and equivocal sera were from Pennsylvania. Of the 200 sera, 66 were from Pennsylvania, resulting in a 3.0% prevalence (2/66) in Pennsylvania.

Table 1

Age	Total	Equivocal	Positive	Prevalence
10-20	12	0	0	0.0%
21-30	68	1	0	1.5%
31-40	63	0	0	0.0%
41-50	47	0	1	2.1%
51-60	10	0	0	0.0%
Total	200	1	1	1.0%

12 LIMITATIONS

- All positive WN IgM Capture ELISA test results are presumptive and require confirmation by Plaque Reduction Neutralization Test or by using the latest CDC guideline for diagnosis of this disease.
- Testing should only be performed on patients with clinical symptoms of meningoencephalitis. This test is not intended for screening the general population. The positive predictive value depends on the likelihood of the virus being present.
- Serological cross-reactivity across the flavivirus group is common (i.e. between St. Louis encephalitis, Eastern Equine, Dengue 1, 2, 3, and 4; Murray Valley encephalitis, Japanese encephalitis and yellow fever viruses). These diseases must be excluded before confirmation of diagnosis.
- IgM antibodies may persist for more than 500 days in up to 60% of cases. Positive results should be interpreted in the context of clinical and other laboratory findings and may not indicate active West Nile virus induced disease.
- Assay results should be interpreted only in the context of other laboratory findings and the total clinical status of the patient.
- The reagents supplied in this kit are optimized to measure WNRA reactive antibody levels in serum.
- The assay performance characteristics have not been established for visual result determination.
- Results from immunosuppressed patients must be interpreted with caution.
- Generally primary responders exhibit mainly monotypic antibody responses. However, during successive infections the antibody response broadens to include heterotypic reactivity to other flaviviruses in the same or different antigenic groups (5).

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Clinical Sensitivity and Specificity

Table 1 – Study Site 1

A clinical laboratory located in the mid-western U.S. tested 50 retrospective samples with clinically and laboratory confirmed cases of WNV (n=50) or undetermined flavivirus (positive for both WNV and SLE; n=2). The samples were suspected to have come from patients that had exhibited signs or symptoms of WN but specific clinical information could not be confirmed. In addition, 125 retrospective sequential endemic samples were tested. The sera were sequentially submitted to the laboratory, archived, and masked. Two were confirmed with undetermined flavivirus or WNV by PRNT.

Clinical Category	Positive	Negative	Equivocal	Total
PRNT Positive	50	2	0	52
Negative	1	121	1	123
Total	51	123	1	175

WN Virus Positive:

Serological Sensitivity = 50/52 = 96.2%

95% Confidence Interval: 87.0 – 98.9%

WN Virus Negative:

Serological Specificity = 121/123 = 98.4%

95% Confidence Interval: 94.3 - 99.6%

Table 2 – Study Site 2

A State Department of Health laboratory located in Midwestern U.S. tested 88 retrospective samples clinically and laboratory confirmed cases of WNV and/or SLE and confirmed by PRNT. Seven patient samples were suspected of having either viral encephalitis or viral meningitis. The remaining patient samples had signs or symptoms of WN fever and headache. In addition, 130 retrospective, sequential endemic samples were tested. The sera were sequentially submitted to the laboratory, archived, and masked. Fourteen (14) were confirmed with SLE and/or WNV by PRNT.

Clinical Category	Positive	Negative	Equivocal	Total
PRNT Positive	99	2	1	102
Negative	1	115	0	116
Total	100	117	1	218

Note: Some of these specimens may have been previously tested for WNV antibodies before being sent to this laboratory for confirmation by PRNT. The possible bias effect on the performance of this assay is unknown.

WN Virus Positive:

Clinical Sensitivity = 99/102 = 97.1%

95% Confidence Interval: 91.7 – 99.0%

WN Virus Negative:

Clinical Specificity = 115/116 = 99.1%

95% Confidence Interval: 95.3 - 99.9%

Table 3 – Study Site 3

A State Department of Health laboratory located in Southeastern U.S. tested 150 retrospective samples clinically and laboratory confirmed cases of WNV by PRNT. In addition, 150 retrospective, sequential endemic samples were tested. The sera were sequentially submitted to the laboratory, archived, and masked. Twenty-three (23) were confirmed with SLE and/or WNV by CDC ELISA.

Clinical Category	Positive	Negative	Equivocal	Total
PRNT Positive	172	1	0	173
Negative	0	127	0	127
Total	172	128	0	300

WN Virus Positive:

Serological Sensitivity = $172/173 = 99.4\%$

95% Confidence Interval: 96.8 – 99.9%

WN Virus Negative:

Serological Specificity = $127/127 = 100.0\%$

95% Confidence Interval: 97.1 - 100%

Table 4 - Study Site 4

A State Department of Health laboratory located in Northeastern U.S. tested 210 retrospective, sequential endemic samples with the West Nile IgM Capture ELISA and with the CDC MAC ELISA. The sera were sequentially submitted to the laboratory, archived, and masked. None of the samples gave a positive result with both tests.

Clinical Category	Positive	Negative	Equivocal	Total
CDC MAC ELISA Positive	0	0	0	0
Negative	0	210	0	210
Total	0	210	0	210

Negative Presumptive Agreement

$210/210 = 100.0\%$

95% Confidence Interval: 98.2 – 100.0%

13.2 Freeze Thaw Study

Eight serum samples were exposed to five freeze-thaw cycles and assayed for IgM antibodies to West Nile recombinant antigen after each cycle. All five serum samples that were positive in the untreated version of the assay were positive after all five freeze-thaw cycles. One sample that was negative but close to being equivocal in the beginning became equivocal at cycles 1, 3, 4 and 5, but not at cycle 2.

It is recommended that serum samples for use in the West Nile IgM Capture ELISA Test not be frozen and thawed for more than five times.

13.3 IgM Specificity Study

Thirteen serum samples, including a positive and a negative control, were treated with dithiothreitol and assayed for IgM antibodies to West Nile recombinant antigen. All nine WNV infected serum samples that were positive in the untreated version of the assay were negative in the dithiothreitol treated version. No substantial effect was seen in the IgG assay.

This study indicates that the West Nile IgM Capture ELISA assay is specific for IgM.

13.4 Interference Study

Four potentially interfering substances commonly occurring in serum were tested for their effect on the West Nile IgM Capture ELISA test. Pools of two West Nile positive sera and one West Nile negative serum were used.

The four potentially interfering substances were Bilirubin (1& 2 mg/dL), Triglycerides (500 and 3000 mg/dL), Hemoglobin (1600 and 16,000 mg/dL) and Cholesterol (300 and 500 mg/dL)

The results of this study indicate that West Nile low positive results with high levels of triglycerides may increase ISR values of WNRA reactive sera.

The other interfering substances did not exhibit any deleterious effect on the sensitivity and specificity of the assay.

13.5 Reproducibility Study

The reproducibility of the West Nile IgM Capture ELISA was evaluated at three sites. Ten serum specimens using clinical specimens diluted into an analyte-negative matrix was used. The ten serum specimens (not including positive and negative controls) included specimens that were below the cutoff values (negative samples) and above the cutoff value (positive and weak positive or borderline samples). The serum dilutions selected also ensured that the analyte concentration in the specimens represented a clinically relevant range. The results were analyzed by an outside statistician and are shown in the table below.

Reproducibility Results from three sites after deleting 2 outlying data points from Site #3

Sample ID	n	Mean	Intra-Assay		Between Day		Between Lab		Total	
			*S.D.	%CV	*S.D.	%CV	*S.D.	%CV	*S.D.	%CV
1	27	1.18	0.07	5.8%	0.14	11.4%	0.29	24.5%	0.33	27.6%
2	27	9.39	1.04	11.0%	3.10	33.1%	1.46	15.5%	3.58	38.2%
3	27	17.98	1.50	8.3%	4.00	22.2%	4.18	23.3%	5.98	33.2%
4	27	6.48	1.04	16.1%	1.98	30.5%	2.47	38.2%	3.33	51.4%
5	26*	21.07	2.54	12.0%	5.53	26.3%	7.56	35.9%	9.70	46.1%
6	27	7.92	0.74	9.4%	2.33	29.5%	3.46	43.7%	4.24	53.5%
7	26*	12.75	1.46	11.4%	2.21	17.3%	3.85	30.2%	4.67	36.6%
8	27	5.94	0.64	10.8%	1.62	27.3%	1.87	31.5%	2.56	43.1%
9	27	24.81	2.53	10.2%	8.86	35.7%	4.23	17.0%	10.14	40.9%
10	27	1.14	0.07	5.8%	0.04	3.2%	0.16	14.3%	0.18	15.8%

All values are calculated as WNRA/NCA ratios

SD = Standard Deviation; %CV = % Coefficient of Variation

26*: 1 statistically outlying ($>5.5 \times$ Standard Deviation of previous run) data point was removed.

13.6 Cross reactivity Study

Two hundred and seventy-one sera that tested positive for other potentially cross-reactive pathogens were tested with the West Nile IgM Capture ELISA test to determine the potential for cross-reactivity. The table below summarizes the results of this study.

Disease	Number of Samples	West Nile Detect IgM ELISA		Total of Positive and Equivocal
		Equivocal	Positive	
Eastern Equine encephalitis	17	0	0	0/17
Japanese encephalitis	2	0	0	0/2
Saint Louis encephalitis	32	1	16	17/32
La Crosse Virus	6	0	0	0/6
Dengue virus	7	0	2	2/7
Epstein-Barr virus	15	0	0	0/15
Hepatitis A virus	10	0	0	0/10
Hepatitis B virus	49	0	0	0/49
Hepatitis C virus	30	0	0	0/30
Herpes simplex virus	32	0	0	0/32
California Encephalitis (CE)	1	0	0	0/1
HIV	20	0	0	0/20
Syphilis	5	0	0	0/5
Cytomegalovirus	12	0	0	0/12
Varicella zoster virus	10	0	0	0/10
Coxsackievirus B 1-6	1	0	0	0/1
Echovirus 16	1	0	0	0/1
Measles	1	0	0	0/1
Mumps	1	0	0	0/1
Polio Blend	1	0	0	0/1
Legionaries' disease	3	0	0	0/3
Rheumatoid factor	5	0	0	0/5
Anti-nuclear antibody	10	0	0	0/10
Total	271	1	18	19/271

1 USO INTESO

Il test ELISA The West Nile IgM Capture è disegnato per il rilevamento qualitativo di anticorpi IgM agli antigeni ricombinanti di west Nile (WNRA) nel siero umano.

Questo test è inteso per la diagnosi clinica della infezione con il virus West Nile in pazienti con sintomi clinici consistenti con la meningoencefalite. Risultati positivi devono essere confermati dal test della riduzione di placche di neutralizzazione (PRNT) oppure usando le norme attuali CDC per la diagnosi di questa malattia.

Le caratteristiche di rendimento del test non sono state stabilite per sangue ombelicale, neonatale e lo screening prenatale o lo screening di popolazioni generalmente senza sintomi di meningoencefalite o con strumenti automatici. Questo saggio non è dichiarato con la FDA o approvato per saggiare sangue o plasma di donatori.

Attenzione:

La reattività ad incrocio è stata notata con alcuni saggi di West Nile che testano campioni contenenti anticorpi ad enterovirus. I risultati reattivi provenienti da bambini devono contenere una dichiarazione di cautela riguardante una possibile reattività ad incrocio con enterovirus.

2 RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'esposizione al virus West Nile causa una malattia con numerosi sintomi incluso l'encefalite. Il virus west Nile (WNV) è un agente potenzialmente neuroinvasivo che causa una infezione asintomatica e febbre in soggetti infetti.

Infezioni umani e animali non sono stati documentati nelle emisfere occidentali fino ad una eruzione nel 1999 nell'area metropolitana di New York City (1,2). Da allora la malattia è distribuita per tutti gli Stati Uniti. Nel 2003, l'attività WNV è stata registrata in 46 stati infettando 9,800 persone.

La maggior parte dei soggetti infetti non hanno sintomi. Una piccola parte sviluppa sintomi deboli che includono febbre, mal di testa, dolori corporei, eruzioni cutanee e nodi linfatici rigonfi. Clinicamente la febbre WNV nei soggetti umani è una malattia auto-limitante acuta accompagnata da mal di testa, mioalgia, poliartropia, eruzione cutanea, sintomi gastrointestinali e adenopatia linfatica (3,4).

Meno di 1% delle persone infette sviluppa una malattia più severa che include L'encefalite o la meningite (5,6).

Il test ELISA West Nile Capture impiega una serie di antigeni ricombinanti di WNV chiamati WNRA, che possono essere usati come marker sierologici rapidi per l'infezione con WNV. La proteina WNRA è un antogene ricombinante che consiste in una sequenza condensata da due antigeni WNV (codati dal gene prM-E).

3 PRINCIPIO DEL TEST

Il test ELISA West Nile Capture consiste in un saggio immunologico amplificato enzimaticamente a sandwich a "due passaggi".

In questo test i controlli e i sieri ignoti sono incubati in pozzetti microtiter che sono stati ricoperti con anticorpi anti-umani IgM. I campioni di siero possono essere mescolati direttamente con il tampone di diluizione del WN IgM e poi aggiunti ai pozzetti. Questo passaggio è seguito da una incubazione con la proteina WNRA ricombinante derivata dal virus West Nile e una preparazione di controllo (NCA) separatamente.

Dopo un ora di incubazione e dopo lavaggi, i pozzetti sono trattati con un anticorpo specifico a WNRA coniugato all'enzima della perossidasi di rafano (HRP).

Dopo una seconda incubazione e un passaggio di lavaggio, i pozzetti sono incubati con il substrato enzimatico benzidine tetrametilico (TMB). Una soluzione acida di arresto è poi aggiunta e l'entità della reazione enzimatica del substrato viene quantificata dalle misure di assorbimento a 450 nanometri.

Sopra un certo valore di soglia, il rapporto di assorbanza di WNRA e del controllo determina se anticorpi a WNV sono presumibilmente presenti.

Un set di controlli positivi e negativi è provisto per monitorare l'integrità dei componenti del kit.

4 MATERIALIE FORNITO

Il test West Nile IgG ELISA contiene sufficienti quantità di reagenti per una piastra di 96 pozzetti (12 x 8 strisce). Ogni test kit contiene i seguenti reagenti:

1. **Strisce microtiter** ricoperti per IgM umano
96 micropozzetti di polistirene (12 x 8 strisce).
ricoperti con anticorpi IgM anti-umano di pecora in ogni pozzetto.
Pronto all'uso. Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

2. Tampone di diluizione per WN IgM

Una bottiglia (25 mL). Pronto all'uso.

Tampone fosfato salino (pH 7,2 - 7,6) con Tween 20, conservante (0,01% timerosal) e aggiuntivi.

Da usare per la diluizione dei campioni del test e dei controlli positivi e negativi.

Stabile a -70 °C fino alla data di scadenza.

Nota: Per uno scongelamento rapido piazzare la bottiglia contenente il tampone di diluizione dei campioni in un contenitore con acqua pulita mantenuta a temperatura ambiente (immerso solo fino alla altezza del contenuto). In seguito al completo scongelamento, estrarre la bottiglia, rimuovere l'eccesso di acqua esteriore con della carta assorbente pulita. Se si vede alcun precipitato dopo il processo di scongelamento, mescolare accuratamente la bottiglia sul vorte per ottenere una soluzione omogenea da usare.

3. Controllo positivo WN IgM umano

Un tubetto (50 µL). Siero positivo inattivato per calore contenente 0.01 % timerosal.

Il controllo positivo WN IgM aiuterà a monitorare l'integrità del test kit.

Stabile a -70 °C fino alla data di scadenza. Prima dell'uso centrifugare i tubetti velocemente per far depositare il contenuto sul fondo.

Nota: Per una conservazione a lungo termine, il siero deve essere aliquotato ulteriormente in volumi più piccoli e conservato a -70 °C.

4. Controllo negativo WN IgM umano

Un tubetto (50 µL). Siero negativo inattivato per calore.

Anche il controllo negativo aiuterà a monitorare l'integrità del test kit.

Stabile a -70 °C fino alla data di scadenza.

Prima dell'uso centrifugare i tubetti velocemente per far depositare il contenuto sul fondo.

Nota: Per una conservazione a lungo termine, il siero deve essere aliquotato ulteriormente in volumi più piccoli e conservato a -70 °C.

5. West Nile antigene (WNRA) per IgM

Un tubetto (5 mL). Pronto all'uso.

Contiene Tween 20, conservante (0,002 - 0,005% Timerosal), antibiotici (0,0025 - 0,004% G418 sulphate), WNV antigeni (WNV PrM e E antigeni non infettivi) e aggiuntivi.

Stabile a -70 °C fino alla data di scadenza.

Attenzione:

Il WNRA non deve essere ripetutamente congelato e scongelato. Si raccomanda di preparare aliquoti di volumi più piccoli e conservati a -70 °C.

6. Antigeni cellulari (NCA) normali pronto all'uso per WN IgM

Un tubetto (5 mL). Pronto all'uso.

Contiene Tween 20, conservante (0,002 - 0,005% timerosal), surnatante di coltura di COS-1 linea cellulare e aggiuntivi.

Stabile a -70 °C fino alla data di scadenza.

Attenzione: Per evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento aliquotare il campione in volumi più piccoli e conservare a -70 °C.

7. Coniugato enzimatico –HRP pronto all'uso per WN IgM

Una bottiglia (9 mL). Pronto all'uso.

Contiene 6B6C-1 mAb (per la proteina E antigene al virus WNV) coniugato co la perossidasi di rafano in tampone fosfato salino (pH 7,2 - 7,6) con Tween 20, conservante (0,01% timerosal) e aggiuntivi.

Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

8. 10X Tampone di lavaggio

Una bottiglia (120 mL). 10X concentrato del tampone fosfato salino con Tween 20, pH 6,7 - 7,1.

Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

Nota: Vedi la preparazione dei reagenti nel procedimento del test per preparare il tampone di lavaggio 1X.

9. EnWash:

Una bottiglia (20 ml). Pronto all'uso.

Tampone fosfato salino con Tween 20, pH 7,2 - 7,6.

Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

10. Substrato liquido TMB

Una bottiglia (12 mL). Pronto all'uso.

Contiene 3,3',5,5'-benzidine tetrametilico (TMB) e perossido di idrogeno in un tampone di acido citrico-citrato (pH 3,3-3,8). Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

Nota: Il substrato deve essere sempre conservato nella bottiglia protetto dalla luce così come è fornito.

11. Soluzione d'arresto

Una bottiglia (9 mL). Pronto all'uso.

1N acido solforico. Usare per terminare la reazione.

Stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

Attenzione: acido forte, portare guanti protettivi, maschera e occhiali di sicurezza. Scaricare il materiale in accordo con le norme e i regolamenti di sicurezza.

5 MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- ELISA Spettrofotometro
- Misure a 450 nm
- Acqua biologica o ultra-pura
- Pompa a vacuum
- Incubatore senza CO₂ a 37 °C. **Nota:** Non utilizzare un incubatore con umidificatore.
- Lavatore per piastre
- Tubetti di polipropilene
- Pipette multicanale e punte
- Parafilm
- Cronometro
- Vortex

6 PRECAUZIONI

PER L'USO DIAGNOSTICO IN VITRO SOLTANTO

- Tutto il materiale umano usato per la preparazione dei controlli è stato testato e trovato negativo per anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana 1 & 2 (HIV 1&2), l'epatite C (HCV) come contro gli antigeni di superficie dekk'epatite B. Comunque, nessun test è in grado di assicurare una sicurezza del 100 % e pertanto tutti i controlli umani e gli antigeni devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Il Centro del Controllo delle Malattie del National Institute of Health raccomanda che agenti potenzialmente infettivi devono essere trattati con un livello 2 di Biosafety.
- Questo test deve essere usato soltanto per campioni di siero. L'uso di sangue intero, plasma o altri campioni non è stato validato.
- Sieri itterici o lipemici o sieri emolitici o con crescita batterica non devono essere usati.
- Non inattivare i sieri per calore.
- Tutti i reagenti devono essere equilibrati a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) prima di iniziare il test. Il test sarà affetto da cambi di temperatura.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei reagenti forniti nel kit e dei campioni.
- Prelevare i reagenti direttamente dalle bottiglie usando pipette con punti puliti. Il trasferimento dei regenti può portare a contaminazioni.
- Micropozzetti non usati devono essere richiusi immediatamente e conservati alla presenza di desiccante. La mancanza di questo passaggio può causare risultati falsi.
- Sistema del substrato:
 - (a) Dato che TMB è suscettibile a contaminazioni di ioni metallici, si raccomanda di evitare il contatto con superfici metallici.
 - (b) Evitare prolungata esposizione alla luce diretta.
 - (c) Alcuni detergenti possono interferire con la reattività die TMB.
 - (d) Il reagente TMB può avere un colore leggermente blu. Questo non avrà effetto sulla sua reattività o sul risultato.
- Un profondo intendimento delle descrizioni tecniche di questo kit è necessario per un uso corretto di questo prodotto. Risultati affidabili possono essere ottenuti soltanto se si usano tecniche precise e seguendo accuratamente il protocollo descritto.
- Non mescolare componenti provenienti da kits con numeri di lotto diversi entro una stessa analisi.
- Non usare un componente dopo la data di scadenza indicate sull'etichetta.
- Evitare l'esposizione dei reagenti a calore o luce solare diretta durante la conservazione e l'incubazione.
- Alcuni reagenti possono formare un leggero precipitato, mescolare cautamente prima dell'uso.
- Un lavaggio incomplete avrà effetti negative sui risultati e la precisione del test.
- Per minimare gli effetti dovuti a differenti tempi di incubazione del substrato, si prega di aggiungere la soluzione d'arresto nei pozzetti nello stesso ordine e nella stessa velocità in cui è stata aggiunta la soluzione substrato TMB.
- Evitare la contaminazione batterica dei reagenti, specialmente quella del coniugato enzimatico concentrato e del diluente del coniugato.
- Evitare la contaminazione della soluzione del substrato TMB con quella dell'enzima coniugato HRP.
- Portare abiti protettivi, protezione per gli occhi e guanti monouso durante il lavoro con it test kit. Lavarsi accuratamente le mani dopo il lavoro.

- Non mangiare, bere, fumare o truccarsi dove materiale immunodiagnostico viene usato.
- Non pipettare con la bocca.
- Usare punte per pipette monouso pulite per ogni reagente, standard, controllo o campione.
- Coprire la superficie di lavoro con carta assorbente.
- Non utilizzare un incubatore con umidificatore.

ATTENZIONE:**MATERIALE BIOLOGICAMENTE POTENZIALMENTE DANNOSO**

Questo kit può contenere reagenti derivati da siero o plasma umano. Il siero o plasma usato è stato inattivato tramite calore se non altrimenti riportato. Usare tutti i sieri e il test kit come se contenessero agenti infettivi. Osservare le norme di sicurezza contro rischi microbiologici durante il lavoro e seguire i procedimento standard per lo scarico dei campioni.

RISCHI CHIMICI:

Safety Data Sheets (SDS) sono disponibili per tutti i componenti del kit. Controllare tutti i SDS prima di iniziare il test. Evitare il contatto con le mani, con gli occhi o le mucose durante il test. Se un contatto è avvenuto, consultare i rispettivi SDS per un trattamento appropriato.

7 RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il sangue ottenuto da venipuntura deve coagulare a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per 30 a 60 minuti e poi essere centrifugato seguendo il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷ (GP44: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline).

- Siero umano deve essere usato per questo test. Sangue intero o plasma non possono essere analizzati direttamente.
- Rimuovere il siero dal coagulo di eritrociti al più presto possibile per evitare l'emolisi.
- Il test deve essere eseguito al più presto dopo la raccolta. Non lasciare il siero a temperatura ambiente per periodi prolungati.
- Il siero deve essere usato e le normali precauzioni durante la raccolta per venopuntura devono essere usati. I campioni devono essere conservati a 2 °C - 8 °C fin a 7 giorni, o congelati a -20 °C o inferiore fino a 30 giorni. Per mantenerli per periodi più lunghi, conservarli a -70 °C. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.
- Non usare sieri emolitici o lipemici.
- Campioni congelati devono essere portati a temperatura ambiente e mescolati accuratamente per inversione prima dell'uso.
- Se i campioni di siero vengono spediti, essi devono essere impacchettati in accordo con le norme federali che regolano i trasporti di agenti infettivi.

8 PROCEDIMENTO DEL TEST**ATTENZIONE:**

Attenersi strettamente al protocollo del test. Ogni deviazione dal procedimento può causare risultati falsi. Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) prima dell'uso. Mescolare i reagenti e i campioni accuratamente per inversione prima dell'uso.

Nota: Per una conservazione a lungo termine, tutti i sieri, incluso quelli sperimentali, non possono essere ripetutamente congelati e scongelati. I sieri devono essere ulteriormente aliquotati in volumi più piccoli e conservati a -70 °C.

8.1 Preparazione dei reagenti**Preparazione del 1X Tampone di lavaggio**

Diluire il tampone di lavaggio 10X ad una concentrazione 1X usando l'acqua biologica o ultra-pura.

Per preparare una soluzione di tampone di lavaggio 1X mescolare 120 mL del tampone 10X con 1080 mL di acqua distillata (o deionizzata) e sciogliere tutti i cristalli. Agitare finché la soluzione è ben mescolata e tutti cristalli sono dissolti.

Dopo la diluizione alla concentrazione 1X, conservare a temperatura ambiente per quattro mesi al massimo.

Nota: Non usare il tampone di lavaggio 1X se si vede una crescita microbica.

Pozzetti microtiter

Selezionare il numero di pozzetti ricoperti necessari per l'analisi. I rimanenti pozzetti devono essere coperti e rimessi velocemente nella busta e conservati a 2 °C - 8 °C fino al momento d'uso o fino alla data di scadenza.

8.2 Procedimento del test

1. Sieri positivi, negativi e ignoti devono essere analizzati in doppio. Far riferimento al diagramma di flusso alla fine di questa sezione per illustrare questo protocollo. Ventidue campioni possono essere analizzati su una piastra a 96 pozzetti.
2. Segnalare le strisce microtiter da usare.

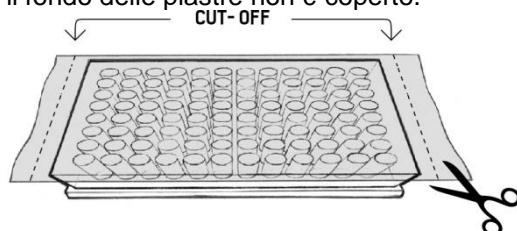
3. Diluire i sieri da analizzare e i controlli a **1/100** usando il tampone di diluizione dei campioni per WN IgM (SD).
(Si possono usare tubetti di polipropilene, piastre multi-pozzetti non trattati oppure piastre per queste diluizioni e si raccomanda di usare almeno 4 µL dei campioni di siero ignoti e dei controlli positivi e negativi.
Per esempio, 4 µL di siero più 396 µL del tampone di diluizione per WN IgN per preparare la diluizione 1/100.)
4. Aggiungere 50 µL/pozzetto dei test sieri diluiti 1/100 e dei controlli alla piastra con pipette appropriate.
Uno schema esemplare per ventidue campioni di siero in doppio è mostrato sotto.

Nota: i campioni e i controlli sono da analizzare entrambi con WNRA e NCA.

Esempio per l'applicazione dei sieri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
B	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
C	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
D	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
E	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
F	IgM Pos.	S#2	S#4	S#6	S#8	S#10	S#12	S#14	S#16	S#18	S#20	S#22
G	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21
H	IgM Neg.	S#1	S#3	S#5	S#7	S#9	S#11	S#13	S#15	S#17	S#19	S#21

5. Coprire la piastra con "parafilm" o coperchi per piastre immediatamente sopra la superficie dei pozzetti, in modo che il fondo delle piastre non è coperto.

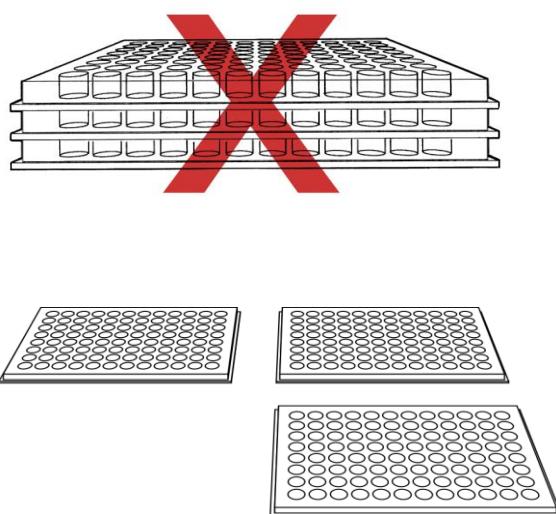


Nota:

Questo assicura che la distribuzione di temperatura è uniforme in tutti i pozzetti dal fondo e dai lati; una volta coperto l'evaporazione è bloccata e ogni superfluo "parafilm" deve essere tagliato.

6. Incubare la piastra a 37 °C per 1 ora in un incubatore. (Non utilizzare un incubatore con umidificatore.)

Nota: Non piazzare piaster una sopra l'altra. Esse devono essere distribuite singolarmente. Questo è molto importante per assicurare una temperatura uniforme. Non usare CO₂ o altri gas usati per la coltura cellulare.



METODO CORRETTO

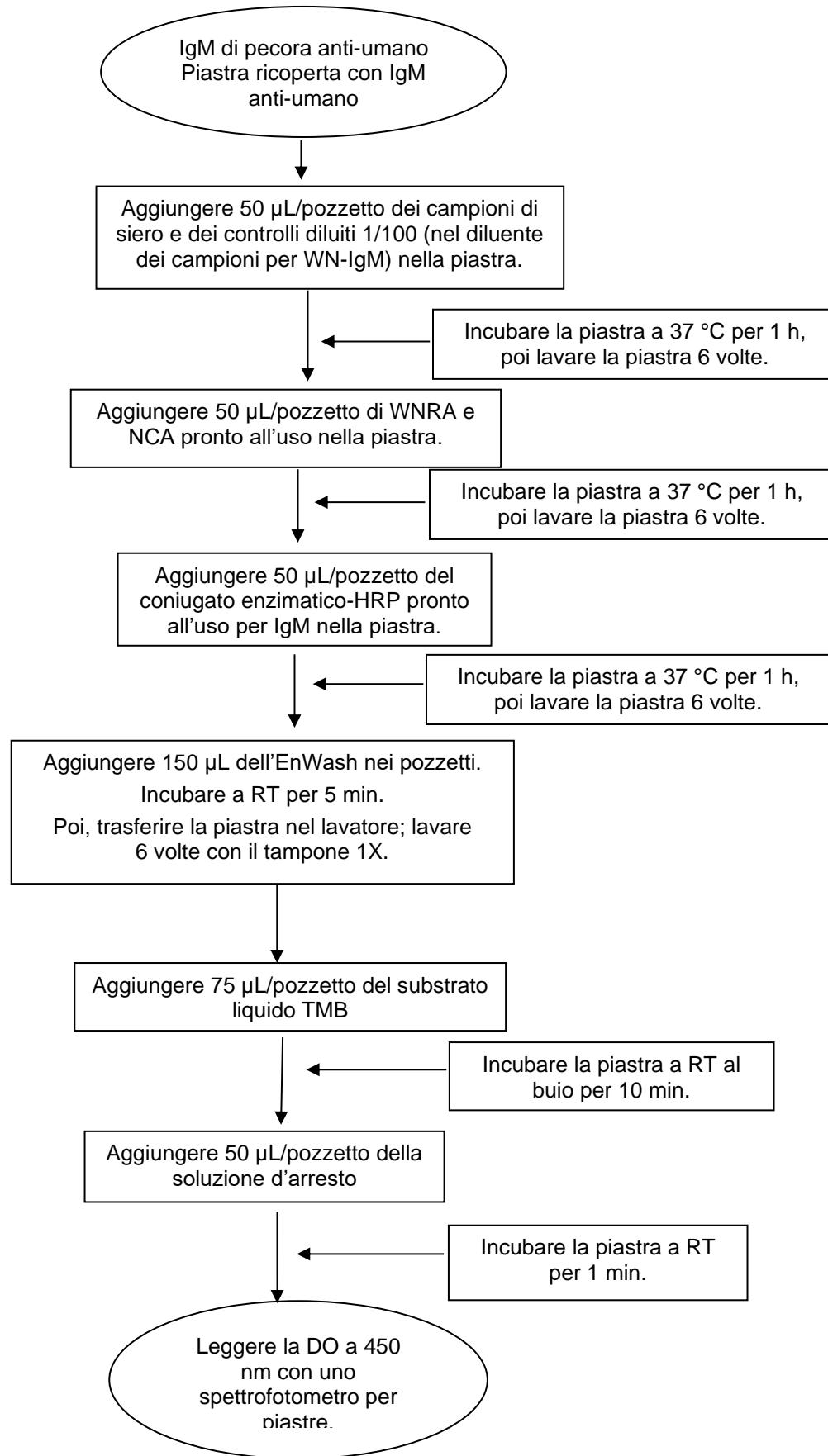
7. Dopo l'incubazione lavare la piastra 6 volte con un lavatore automatico usando il tampone di lavaggio 1X.
Usare 300 µL /pozzetto in ogni ciclo di lavaggio.
8. Aggiungere 50 µL per ogni pozzetto di WNRA nella colonna A-D e 50 µL /pozzetto di NCA nella colonna E-H con multipipette.
Una applicazione esemplare per WNRA e NCA è mostrata sotto.

Esempio per l'applicazione degli antigeni WN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WN RA											
B	WN RA											
C	WN RA											
D	WN RA											
E	NCA											
F	NCA											
G	NCA											
H	NCA											

9. Coprire la piastra con il "parafilm" immediatamente sull'apertura dei pozzetti, in modo che il fondo della piastra non è coperto. (*come descritto nel passaggio 5*)
10. Incubare la piastra a 37 °C per 1 ora in un incubatore. (Non utilizzare un incubatore con umidificatore.)
11. Dopo l'incubazione, lavare la piastra 6 volte con un lavatore automatico usando il tampone di lavaggio 1X. Usare 300 µL/pozzetto per ogni ciclo.
12. Aggiungere 50 µL /pozzetto del coniugato enzimatico-HRP pronto all'uso in tutti i pozzetti con una multipipetta.
13. Coprire la piastra con il parafilm immediatamente sopra la superficie dei pozzetti, in modo che il fondo della piastra non è coperto. (*come descritto nel passaggio 5*)
14. Incubare la piastra a 37 °C per 1 ora in un incubatore. (Non utilizzare un incubatore con umidificatore.)
15. Dopo l'incubazione lavare la piastra 6 volte con un lavatore automatico usando il tampone di lavaggio 1X. Usare 300 µL/pozzetto in ogni ciclo.
16. Aggiungere 150 µL/pozzetto dell'EnWash in ogni pozzetto con una pipette multicanale.
17. Incubare la piastra a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per 5 minuti. Non coprire la piastra.
18. Lavare la piastra 6 volte con un lavatore automatico usando il tampone di lavaggio 1X. Usare 300 µL/pozzetto per ogni ciclo.
19. Aggiungere 75 µL /pozzetto del substrato liquido TMB in ogni pozzetto usando una pipette multicanale.
20. Incubare la piastra a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) in un posto buio (o in un contenitore) per 10 minuti senza coprire la piastra.
21. Dopo l'incubazione, aggiungere 50 µL / ogni pozzetto della soluzione d'arresto usando una pipette multicanale e incubare a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per 1 minuto. Non coprire la piastra.
22. Dopo l'incubazione, leggere la densità ottica OD 450 con uno spettrofotometro per micropiastre.

PER OTTENERE RISULTATI ACCURATI, NON SOTTRARRE LETTURE BLANK.

Diagramma di flusso per il West Nile IgM Capture ELISA

9 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni kit contiene sieri di controllo positivo e negativo. Valori del rapporto dello stato immunitario (ISR) accettabile per questi controlli si trovano nella tabella di specificazione sotto. I controlli positivi e negativi sono intesi per monitorare errori sostanziali dovuti ai reagenti. Il controllo positivo non assicura la precisione del valore di soglia del test. Il test è invalido e deve essere ripetuto se il valore ISR di uno dei controlli non sta all'interno della specificazione. Se il test è invalido, i risultati dei pazienti non possono essere comunicati. Le richieste del controllo qualità devono essere eseguite in accordo con le norme locali, statali e/o federali o in accordo con le richieste di certificazioni e con le richieste del controllo qualità del vostro laboratorio. Si raccomanda di riferirsi alla CLSI C24 e 42 CFR 493.1256 per valori guida sulle pratiche QC appropriate. I risultati sotto sono dati come valori guida unicamente e sono applicabili soltanto per misure spettrofotometriche. Nota: Non sottrarre il valore di fondo ("blank") dalle letture di DO.

Calcolo del controllo negativo:

Calcolare il valore medio dei valori del controllo negativo con WNRA e con l'antigene di controllo:

Esempio: Controllo negativo (NC)

	DO WNRA	NCA
No. 1	0,085	0,076
No. 2	0,075	0,060
Totale	0,160	0,136

$$\text{Medio (WNRA)} = 0,160 \div 2 = 0,080$$

$$(\text{NCA}) = 0,136 \div 2 = 0,068$$

$$\text{Calcolare il rapporto WNRA/NCA: } 0,080 \div 0,068 = 1,18.$$

Ogni rapporto WNRA/NCA di un controllo negativo superiore di 4,47 indica che il test è invalido e deve essere ripetuto.

Calcolo del controllo positivo:

Calcolare i valori del controllo positivo con il WNRA e con il NCA.

Esempio: Controllo positivo (PC)

	DO WNRA	NCA
No 1	0,935	0,090
No 2	0,955	0,078
Totale	1,890	0,168

$$\text{Medio (WNRA)} = 1,890 \div 2 = 0,945$$

$$(\text{NCA}) = 0,168 \div 2 = 0,084$$

$$\text{Calcolare il rapporto WNRA/NCA: } 0,945 \div 0,084 = 11,3.$$

Ogni rapporto WNRA/NCA di un controllo positivo inferiore a 5,66 indica che il test è invalido e deve essere ripetuto.

I risultati nella tabella seguente devono essere ottenuti per assicurare che i risultati del test possono essere comunicati. Criteri non osservati sono un indicatore del deterioramento dei reagenti o di un errore nel procedimento del test e il saggio deve essere ripetuto.

Fattore	Tolleranza
Medio del controllo negativo (NC) DO per WNRA	< 0,300
Medio del controllo positivo (PC) DO per WNRA	> 0,500
PC Rapporto dello stato immunitario (ISR)	> 5,66
NC Rapporto dello stato immunitario (ISR)	< 4,47

10 CALCOLO

Calcolo del rapporto dello stato immunitario (ISR):

Calcolare il valore medio dei campioni replicanti con il WNRA, dei campioni replicanti con il NCA, poi calcolare il rapporto WNRA/NCA (ISR) per tutti i campioni ignoti allo stesso modo come è stato fatto per i controlli positivi e negativi.

Calcolo dei valori ISR per i sieri ignoti:

Calcolare il valore medio dei valori ISR dei sieri:

Esempio: Test Siero #1

	DO	
	WNRA	NCA
No. 1	0,195	0,066
No. 2	0,205	0,070
Totale	0,400	0,136

$$\text{Valori medi (WNRA)} = 0,400 / 2 = 0,200 \quad (\text{NCA}) = 0,136 / 2 = 0,068$$

$$\text{Calcolare il rapporto WNRA/NCA: } 0,200 / 0,068 = 2,94$$

Ogni siero con un rapporto WNRA/NCA inferiore a 4,47 indica che non sono presenti anticorpi IgM rilevabili. Si veda le sezione della interpretazione dei risultati.

Esempio: Test Siero #2

	DO	
	WNRA	NCA
No. 1	0,695	0,085
No. 2	0,725	0,100
Totale	1,420	0,185

$$\text{Valori medi (WNRA)} = 1,42 / 2 = 0,71 \quad (\text{NCA}) = 0,185 / 2 = 0,0925$$

$$\text{Calcolare il rapporto WNRA/NCA: } 0,710 / 0,0925 = 7,68$$

Ogni siero con un rapporto WNRA/NCA superiore a 5,66 indica che anticorpi IgM rilevabili sono presenti. Si veda le sezione della interpretazione dei risultati.

Esempio: Test Siero #3

	DO	
	WNRA	NCA
No. 1	0,310	0,065
No. 2	0,295	0,070
Totale	0,605	0,135

$$\text{Valori medi (WNRA)} = 0,605 / 2 = 0,3025 \quad (\text{NCA}) = 0,135 / 2 = 0,0675$$

$$\text{Calcolare il rapporto WNRA/NCA: } 0,3025 / 0,0675 = 4,48$$

Ogni siero con un rapporto WNRA/NCA superiore a 4,47 ma inferiore a 5,66 è un risultato equivoco e non permette di trarre conclusioni. Si veda le sezione della interpretazione dei risultati.

Selezione del valore soglia (cut-off):

Il valore soglia è stato scelto usando sieri di una popolazione endemica degli Stati Uniti. I 282 campioni consistevano in 163 campioni positivi e 119 campioni negativi caratterizzati dal test ELISA capture CDC anticorpi IgM. Il valore soglia è stato determinato dall'analisi two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC).

Interpretazione dei risultati:

Il test West Nile Detect IgM Capture ELISA determina la presenza di anticorpi al virus WN nel siero di pazienti con sintomi clinici di meningoencefalite. Un risultato positivo indica presumibilmente una meningoencefalite WNV. La seguente tabella mostra come i risultati devono essere interpretati.

ISR	Risultato	Interpretazione
< 4,47	Negativo	Anticorpi IgM non rilevabili, i soggetti non sembrano essere infetti con il WN virus. I risultati non escludono una infezione con WN virus. Un ulteriore campione deve essere analizzato entro 7-14 giorni se si sospetta una infezione più recente. Altri test di rilevamento del WN virus dovrebbero essere usati per escludere una infezione acuta. Riferirsi alle norme CDC attuali per la diagnosi della malattia ¹ .
4,47 – 5,66	Equivoco	Campioni equivoci devono essere ripetuti in doppio. Se entrambi i replicanti sono inferiore o superiore ai valori di soglia, i campioni possono essere definiti o positive o negative, rispettivamente. Per i campioni che rimangono equivoci dopo aver ripetuto il test si deve comunicare che gli anticorpi IgM al virus WN non possono essere determinati. I sieri devono essere analizzati con un metodo alternativo o un nuovo campione deve essere raccolto.
> 5,66	Positivo	La presenza di anticorpi IgM rilevabili indica presumibilmente una infezione con il virus WN. I risultati devono essere confermati dal test di riduzione delle placche di neutralizzazione (PRNT) o alternativamente si consulta le norme CDC per la diagnosi di questa malattia ¹ . Un risultato positivo IgM può non indicare una infezione recente. Gli anticorpi IgM al virus WN sono persistenti per oltre 500 giorni ⁶. Una reattività ad incrocio sierologica tra il gruppo dei flavivirus è comune (p.es. tra l'encefalite di St. Louis, sierotipi die dengue 1,2,3 e 4; l'encefalite di Murray Valley; l'encefalite giapponese; e i virus della febbre gialla). Inoltre, la reattività ad incrocio è stata notata con alcuni test per il virus West Nile con gli enterovirus. I risultati reattivi in bambini devono contenere una dichiarazione di cautela rispetto alla possibile reattività incrociata con gli enterovirus. Queste malattie devono essere escluse prima di confermare la diagnosi.

Il seguente paragrafo è un metodo raccomandato per comunicare i risultati ottenuti:

"I seguenti risultati sono stati ottenuti con il test DRG West Nile IgM Capture ELISA. I valori ottenuti con altri metodi di test possono non essere interscambiabili. L'entità dei risultati misurati, al di sopra del valore di soglia, non è indicativo della quantità totale di anticorpi presenti." I risultati devono essere riportati come positivi, negativi o equivoci e non come valori numerici. I risultati riportati devono contenere una interpretazione appropriata.

11 VALORI ASPETTATI

L'infezione con il virus West Nile è generalmente riconosciuta dalla presenza di anticorpi IgM entro una settimana dall'inizio dei sintomi. Livelli rilevabili di IgM possono essere bassi nello stato precoce della malattia.

Duecento campioni sono stati raccolti in Florida, Texas e Pennsylvania durante marzo 2004. La distribuzione delle donne era 50% (100/200) e dei maschi era 50% (100/200). I dati in tabella 1 illustrano la prevalenza di anticorpi IgM in differenti gruppi di età usando il West Nile IgM Capture ELISA Test.

Dei 200 sieri normali, uno è stato rilevato positivo e uno era equivoco. Quest'ultimo campione è stato ripetuto in doppio e rimaneva equivoco nel test West Nile IgM Capture ELISA. I sieri positivi e equivoci derivavano dalla Pennsylvania. Dei 200 sieri, 66 derivavano dalla Pennsylvania, risultando in una prevalenza del 3.0 % (2/66) in Pennsylvania.

Tabella 1

Età	Totale	Equivoci	Positivi	Prevalenza
10-20	12	0	0	0.0%
21-30	68	1	0	1.5%
31-40	63	0	0	0.0%
41-50	47	0	1	2.1%
51-60	10	0	0	0.0%
Total	200	1	1	1.0%

12 LIMITI

- Tutti i risultati ottenuti con il WN IgM Capture ELISA test sono presunti e richiedono una conferma con il test die neutralizzazione della riduzione di placche o usando le line guide recenti CDC per la diagnosi di questa malattia.
- Il test deve essere eseguito soltanto per pazienti con sintomi clinici di meningoencefalite. Questo test non è inteso per lo screening di popolazioni in generale. Il valore positivo di predizione dipende dalla probabilità che il virus sia presente.
- La reattività sierologica ad incrocio tra gruppi di flavivirus è riconosciuta (p.es. tra l'encefalite di St. Louis, sierotipi die dengue 1,2,3 e 4; l'encefalite di Murray Valley; l'encefalite giapponese; e i virus della febbre gialla). Queste malattie devono essere escluse prima di confermare la diagnosi.
- Gli anticorpi IgM possono persistere per oltre 500 giorni in ca. 60 % dei casi. I risultati positivi devono essere interpretati all'interno del contesto del quadro clinico e di altre diagnosi di laboratorio e non indica necessariamente una malattia indotta da virus attivi die West Nile.
- I risultati del test devono essere interpretati soltanto nel contesto di altri risultati di laboratorio e del quadro clinico del paziente.
- I reagenti forniti in questo kit sono stati ottimizzati per misurare il livello di anticorpi reattivi contro WNRA nel siero.
- Le caratteristiche di rendimento di questo test non sono state validate per determinazioni visuali.
- I risultati ottenuti in pazienti immunosoppressi devono essere interpretati con cautela.
- Generalmente, pazienti con una risposta primaria mostrano soprattutto anticorpi monotypici. Comunque durante una infezione successiva la risposta anticorpale diventa più ampia includendo reattività eterotipica ad altri flavivirus dello stesso o di diversi gruppi antigenici (5).

13 CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

13.1 Sensitività e specificità clinica

Tabella 1 – Studio Sito 1

Un laboratorio clinico localizzato del medio-ovest degli Stati Uniti ha analizzato 50 campioni retrospettivi di casi confermati clinicamente e analiticamente di WNV (n=50) o di casi con flavivirus indeterminati (positivi per WNV e SLE; n=2). I campioni erano sospetti di derivare da pazienti con sintomi di WN ma specifiche informazioni cliniche non potevano essere confermate. Inoltre, 125 campioni retrospettivi endemici sequenziali sono stati analizzati. I sieri erano spediti sequenzialmente al laboratorio, archiviati e mascherati. Due di questi sono stati confermati con flavivirus indeterminati o WNV dal PRNT.

Categoria clinica	Positivi	Negativi	Equivoci	Totale
PRNT Positivi	50	2	0	52
Negativi	1	121	1	123
Totale	51	123	1	175

WN Virus Positivi:

Sensitività sierologica = 50/52 = 96,2%

95% Intervallo di confidenza: 87,0 – 98,9%

WN Virus Negativi:

Specificità sierologica = 121/123 = 98,4%

95% Intervallo di confidenza: 94,3 – 99,6%

Tabella 2 – Studio Sito 2

Un dipartimento di sanità statale localizzato del medio-ovest degli Stati Uniti ha analizzato 88 campioni retrospettivi di casi clinicamente e analiticamente confirmati di WNV e/o di SLE e confirmati dal PRNT. Sette campioni di pazienti erano sospettati di avere o una encefalite virale o una meningite virale. I rimanenti campioni provenivano da pazienti con sintomi di febbre WN e mal di testa. Inoltre, 130 campioni retrospettivi endemici sequenziali sono stati analizzati. I sieri erano spediti sequenzialmente al laboratorio, archiviati e mascherati. Quattordici (14) di questi sono stati confermati con SLE o WNV dal PRNT.

Categoria clinica	Positivi	Negativi	Equivoci	Totale
PRNT Positivi	99	2	1	102
Negativi	1	115	0	116
Totale	100	117	1	218

Nota: Alcuni dei campioni possono essere stati analizzati previamente per anticorpi WNV prima di essere spediti al laboratorio per la confermazione PRNT. L'effetto bias possibile sul rendimento del test non è noto.

WN Virus Positivi:

Sensitività clinica = 99/102 = 97.1%

95% Intervallo di confidenza: 91.7 – 99.0%

WN Virus Negativi:

Specificità clinica = 115/116 = 99.1%

95% Intervallo di confidenza: 95.3 - 99.9%

Tabella 3 – Studio Sito 3

Un dipartimento di sanità statale localizzato del medio-ovest degli Stati Uniti ha analizzato 150 campioni retrospettivi di casi clinicamente e analiticamente confirmati di WNV e confirmati dal PRNT. Inoltre, 150 campioni retrospettivi endemici sequenziali sono stati analizzati. I sieri erano spediti sequenzialmente al laboratorio, archiviati e mascherati. Ventitre (23) di questi sono stati confermati con SLE o WNV dal CDC ELISA.

Categoria clinica	Positivi	Negativi	Equivocal	Totale
PRNT Positivi	172	1	0	173
Negativi	0	127	0	127
Totale	172	128	0	300

WN Virus Positivi:

Sensitività sierologica = $172/173 = 99.4\%$

95% Intervallo di confidenza: 96.8 – 99.9%

WN Virus Negativi:

Specificità sierologica = $127/127 = 100.0\%$

95% Intervallo di confidenza: 97.1 - 100%

Tabella 4 – Studio Sito 4

Un dipartimento di sanità statale localizzato del nord-est degli Stati Uniti ha analizzato 210 campioni retrospettivi sequenziali endemici con il West Nile IgM Capture ELISA e con il CDC MAC ELISA. I sieri erano spediti sequenzialmente al laboratorio, archiviati e mascherati. Nessuno dei campioni dava un risultato positivo in entrambi i test

Categoria clinica	Positivi	Negativi	Equivoci	Totale
CDC MAC ELISA Positivi	0	0	0	0
Negativi	0	210	0	210
Totale	0	210	0	210

Accordo presunti negativi

$210/210 = 100.0\%$ 95% Intervallo di confidenza: 98.2 – 100.0%

13.2 Studio congelamento scongelamento

Otto campioni di siero sono stati esposti a cinque cicli di congelamento-scongelamento e analizzati per anticorpi IgM contro antigeni ricombinanti di West Nile dopo ogni ciclo. Tutti i cinque sieri che erano positivi nella versione non trattata risultavano positivi dopo tutti i cinque cicli. Un campione che era negativo ma vicino ad un valore equivoco all'inizio, diventava equivoco dopo il ciclo 1,3,4 e 5, ma non dopo il ciclo 2.

Si raccomanda che i campioni di sieri da usare per West Nile IgM Capture ELISA Test non vengano congelati e scongelati per più di 5 volte.

13.3 Studio di Specificità IgM

Tredici campioni di siero, incluso i controlli positivi e negativi, sono stati trattati con dithiothreitololo e analizzati per anticorpi IgM contro l'antigene ricombinante di West Nile. Tutti i nove sieri infetti con WNV che erano positivi nella versione non trattata erano negativi nella versione trattata con dithiothreitololo. Nessun effetto sostanziale è stato osservato nel test IgG. Questo studio indica che il test West Nile IgM Capture ELISA è specifico per IgM.

13.4 Studio di interferenza

Quattro sostanze potenzialmente interferenti e frequentemente presenti nel siero sono state analizzate per la loro capacità di avere effetti sul test West Nile IgM Capture ELISA. Pools di due sieri positivi al West Nile e un siero negativo al west Nile sono stati usati.

Le quattro sostanze potenzialmente interferenti erano bilirubina (1& 2 mg/dL), trigliceridi (500 and 3000 mg/dL), emoglobina (1600 and 16,000 mg/dL) e colesterolo (300 and 500 mg/dL).

I risultati di questo studio indicano che i risultati debolmente positive al West Nile con alti livelli di trigliceridi possono innalzare i valori ISR nei sieri reattivi a WNRA.

Le altre sostanze interferenti non avevano alcun effetto sulla sensitività e la specificità del test.

13.5 Studio di riproducibilità

La riproducibilità del test ELISA West Nile IgM Capture è stata valutata a tre lati. Dieci campioni di siero usando campioni clinici diluiti in una matrix negativa all'analita sono stati analizzati. Questi dieci campioni (non includendo i controlli positivi e negativi) incluso campioni che erano inferiori al valore di soglia (campioni negativi) e superiori al valore soglia (positivi e debolmente positivi o campioni borderline) sono stati saggiati. Le diluizioni scelte assicuravano che la concentrazione dell'analita nei campioni rappresentavano un campo rilevante clinicamente. I risultati sono stati analizzati da esperti statistici esterni e sono riportati nella seguente tabella.

Risultati di riproducibilitá risultanti dall'esperimento a tre lati dopo la delezione di due dati fuori dal campo dal lato #3

campione ID	n	Medio	Intra-Assay		Tra giorni differenti		Tra laboratori		Totale	
			*S.D.	%CV	*S.D.	%CV	*S.D.	%CV	*S.D.	%CV
1	27	1.18	0.07	5.8%	0.14	11.4%	0.29	24.5%	0.33	27.6%
2	27	9.39	1.04	11.0%	3.10	33.1%	1.46	15.5%	3.58	38.2%
3	27	17.98	1.50	8.3%	4.00	22.2%	4.18	23.3%	5.98	33.2%
4	27	6.48	1.04	16.1%	1.98	30.5%	2.47	38.2%	3.33	51.4%
5	26*	21.07	2.54	12.0%	5.53	26.3%	7.56	35.9%	9.70	46.1%
6	27	7.92	0.74	9.4%	2.33	29.5%	3.46	43.7%	4.24	53.5%
7	26*	12.75	1.46	11.4%	2.21	17.3%	3.85	30.2%	4.67	36.6%
8	27	5.94	0.64	10.8%	1.62	27.3%	1.87	31.5%	2.56	43.1%
9	27	24.81	2.53	10.2%	8.86	35.7%	4.23	17.0%	10.14	40.9%
10	27	1.14	0.07	5.8%	0.04	3.2%	0.16	14.3%	0.18	15.8%

Tutti i valori sono calcolati come rapporti WNRA

SD = deviazione standard; %CV = % Coefficiente di variabilitá

26*: 1 punto data statisticamente fuori campo ($>5.5 \times$ deviazione standard dei saggi anteriori) rimosso.

13.6 Studio di reattività ad incrocio:

Duecentosettantuno sieri che sono stati testati positivi per altri patogeni potenzialmente reattivi ad incrocio sono stati testati con il test ELISA West Nile Capture IgM per determinare il potenziale di reattività ad incrocio. La seguente tabella riassume i risultati di questo studio.

Malattia	Numero di campioni	West Nile Detect IgM ELISA		Totale di Positivi ed Equivoci
		Equivoci	Positivi	
Encefalite equina orientale	17	0	0	0/17
Encefalite giapponese	2	0	0	0/2
Encefalite di Saint Louis	32	1	16	17/32
Virus La Crosse	6	0	0	0/6
Virus Dengue	7	0	2	2/7
Virus Epstein-Barr	15	0	0	0/15
Virus epatite A	10	0	0	0/10
Virus epatite B	49	0	0	0/49
Virus epatite C	30	0	0	0/30
Virus Herpes simplex	32	0	0	0/32
Encefalite di California (CE)	1	0	0	0/1
HIV	20	0	0	0/20
Sifillide	5	0	0	0/5
Citomegalovirus	12	0	0	0/12
Virus Varicella zoster	10	0	0	0/10
Coxsackievirus B 1-6	1	0	0	0/1
Echovirus 16	1	0	0	0/1
Varicella	1	0	0	0/1
Parotite	1	0	0	0/1
Polio Blend	1	0	0	0/1
Malattia del legionario	3	0	0	0/3
Fattori reumatici	5	0	0	0/5
Anticorpi Anti-nucleari	10	0	0	0/10
Totale	271	1	18	19/271

14 REFERENCES / LITERATURE / BIBLIOGRAFIA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Update: West Nile-like viral encephalitis—New York, 1999. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48:890-2.
2. Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. Emerging Infectious Diseases Jul-Aug 2000;6:319-328.
3. Hayes CG. West Nile fever. In: T.P. Monath, editor. The arboviruses: epidemiology and ecology. Vol. 7. Boca Raton (FL): CRC Press Inc.;1989. p.59–88.
4. Monath, T.P., and T.F. Tsai. 1997. Flaviviruses, p.1133-1186. In D.D.Richman, R.J. Whitley, and F.G. Hayden (ed.), Clinical virology, Churchill-Livingstone, New York, N.Y.
5. First Isolation of West Nile virus from a Patient with Encephalitis in the United States. Huang et al. Emerging Infectious Diseases Dec 2002; 8(12):1367-1371
6. Asnis, D.S., R. Conetta, A.A. Teixeira, G. Waldman, and B.A. Sampson. 2000. The West Nile outbreak of 1999 in New York: the flushing hospital experience. Clin.Infect. Dis. 30:413-418.
7. CLSI. GP44: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline.

15 TROUBLESHOOTING

Problem	Possible Cause	Possible Resolution
High Absorbances for WNRA/NCA (Incubator temperature must be verified with a source independent of incubator external display)	Incorrect component used	Do not combine controls or reagents between different lots of the ELISA kits.
	Samples incorrectly diluted/Wrong samples used	Sera should be diluted 1:100 in kit's sample dilution buffer. This kit has been validated for use with sera samples only.
	Cross contamination of wells	A new tip must be used for every test or control sera.
	Incomplete washing of wells	Wells must be completely filled and emptied 6 times during each wash cycle.
	Incubation times too long	Incubation times vary; please refer to the "Test Procedure" section for correct times.
	Conjugate contamination with TMB	It is recommended to use a new pipette/pipette tip each time to dispense conjugate and TMB.
	Incorrect wavelength filter	The optical density readings must be read with only a 450nm filter. There must not be any background subtraction.
Low Absorbances for WNRA/NCA (Incubator temperature must be verified with a source independent of incubator external display)	Samples incorrectly diluted	Sera should be diluted 1:100 in kit's sample dilution buffer.
	Kit expiration date and storage	Verify that the kit is not expired and that components were properly stored
	Incorrect component used	Do not combine controls or reagents between different lots of the ELISA kits.
	Component temperatures	All kit components must be equilibrated at room temperature for optimal performance.
	Incubation times too short	Incubation times vary; please refer to the "Test Procedure" section for correct times.
	Incubation temperature too low	Verify that incubators are calibrated and that the temperatures are monitored.
	WNRA/NCA contamination	The antigens are very susceptible to contamination. It is recommended to use a new pipet/pipette tip each time to dispense antigens. Keep the lid on the antigens unless in use. When possible, dispense antigens in a clean laminar flow hood or biological safety cabinet.
	Conjugate contamination	The conjugate is very susceptible to contamination. It is recommended to use a new pipet/pipette tip each time to dispense conjugate. Keep the lid on the conjugate unless in use. When possible, dispense conjugate in a clean laminar flow hood or biological safety cabinet.
	TMB contamination with Stop solution	It is recommended to use a new pipet/pipette tip each time to dispense TMB and stop solution.
	Use of reagents in the wrong sequence, or omission of step(s)	Check the "Test Procedure" section and component labels prior to use.
	Incorrect wavelength filter	The optical density readings must be read with only a 450nm filter. There must not be any background subtraction.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	In vitro diagnostic medical device *	In-vitro-Diagnostikum *	Diagnistica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade