



INGEZIM INFLUENZA PORCINA 2.0

Prod Ref: 11.FLU.K1

Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al virus influenza A en suero de cerdo.

Enzymatic immunoassay for detection and quantification of antibodies specific for influenza A viruses in porcine serum

Última revisión / Last revision: 15-12-20

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 10464-RD

Version 26-11-20:

- Cambio de diluyente de muestras/ *change of sample diluent*
- Cambio a conjugado listo para su uso/*change to ready to use conjugate*

COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo	2 placas (T)		5 placas (T)	
	2 placas (Strip)		5 placas (Strip)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos 96 Well microtitration plates (8x12 wells)	2	-	5	-
Viales de Control Positivo Positive control vials	1	2 ml	2	2 ml
Viales de Control Negativo Negative control vials	1	2 ml	2	2 ml
Viales de Conjugado (listo para su uso) Vials with conjugate (ready to use)	1	30 ml	2	30 ml
Fascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Diluyente (DE34-01) listo para su uso Bottles with diluent ready to use(DE34-01)	1	100 ml	2	100 ml
Fascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate buffer (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Fascos de Solución de Frenado Bottles with stop solution	1	60 ml	1	60 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Agua destilada o desionizada
 Micropipetas de 5 a 200 μ l.
 Puntas de micropipeta de un solo uso
 Dispositivos para lavado de placas.
 Probetas de 50-250ml
 Lector ELISA (filtro de 450 nm)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático indirecto (**ELISA Indirecto**), que se describe brevemente a continuación:

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno) se fija el antígeno viral. Cuando sobre el antígeno se dispensan los sueros, en el caso de que haya anticuerpos frente al virus, estos se unirán a él.

Tras eliminar todo el material no adherido a la placa mediante sucesivos pasos de lavado, se añade un anticuerpo monoclonal específico de inmunoglobulina de cerdo, el cual se unirá a los anticuerpos fijados al

antígeno de los sueros positivos. Tras un nuevo paso de lavado podremos revelar la presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal marcado, añadiendo un sustrato adecuado, que en presencia de peroxidasa dará lugar a una reacción colorimétrica medible. De esta forma, la presencia de color en el pocillo indicará la presencia de anticuerpos específicos frente al virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la ausencia de anticuerpos específicos de influenza

II. 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.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
6. No pipetear los reactivos con la boca. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
8. Usar únicamente agua destilada para la reconstitución de los reactivos.
9. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. Tanto el sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.
11. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. CONSERVACIÓN DEL KIT

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

IV. 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 sosa, ya que si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infecciosos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.

INGEZIM INFLUENZA PORCINA 11.FLU.K1

- 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.

V. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de suero se valoran a la dilución 1/100 (por ejemplo, diluir en un tubo 5 µl de suero hasta 0,5 ml con diluyente).

VI. PREPARACION DE REACTIVOS:

- **Solución de lavado:**
Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada suministrada, en 24 partes de agua destilada (40 ml de concentrado y 960ml de H₂O). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- **Sueros Control (+) y (-), diluyente y conjugado:**
Todos estos reactivos se presentan listos para su uso. No es necesaria preparación alguna. Añadir 100 µl de cada uno de ellos a los pocillos correspondientes.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, sacar las tiras o placas que se vayan a usar y equilibrar a temperatura ambiente junto con el resto de los componentes del kit. Las tiras no utilizadas guardarlas en una bolsa cerrada con un desecante.
2. Dispensar 100 µl/pocillo de cada una de las diluciones de suero a testar. Añadir 100 µl de los controles, en último lugar. Tanto los controles como las muestras, es recomendable ensayarlas por duplicado. Incubar 1 hora a 37°C ± 1°C.
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl a cada pocillo de conjugado
5. Tapar la placa e incubar a 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
5. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispuso el sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS

A. Validación del test:

El test se considera válido cuando:

- La relación:

$$\frac{\text{DO Control Negativo}}{\text{DO Control Positivo}} < 0.2$$

- El valor de DO del control positivo debe ser ≥ 1

B. Interpretación de resultados:

Si se están analizando las muestras por duplicado, se tomarán como valor de DO, la media de los valores obtenidos en ambos pocillos.

Se determinará para cada muestra (M) su relación M/P, es decir, su valor de absorbancia dividido por el valor del control positivo (P):

$$\text{Relación M/P} = \text{Abs Muestra} / \text{Abs (CP)}$$

- Las muestras de suero con un valor de M/P igual o superior a 0.2 se considerarán positivas con títulos iguales o superiores a 1/100.
- Las muestras con valores de M/P inferiores a 0.2 se considerarán negativas.

C. Título del suero:

El título de los sueros positivos se determinará aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Título muestra} = 2222 \times [(M/P)^{1.93}]$$

D. Ejemplo:

$$\text{Abs Control Negativo} = 0.050$$

$$\text{Abs Control Positivo} = 1.708$$

$$\text{Validación} = 0.050 / 1.708 = 0.029 (< 0,2)$$

$$\text{Abs media de la muestra} = 0.543$$

$$\text{Relación M/P} = 0.543 / 1.708 = 0.318$$

$$\text{Título muestra} = 2222 \times (0.318^{1.93}) = 244$$

INGEZIM INFLUENZA PORCINA

11.FLU.K1

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzyme immunoassay (Indirect ELISA). A brief description of the technique is given below:

The antigen is coated on polystyrene plates. When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non-fixed material the presence of swine antibodies can be detected using a

specific peroxidase conjugate. After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear that can be measured by a spectrophotometer.

The presence of colour indicates the presence of antibodies against the virus in the swine sera, and the absence of colours, the absence of specific antibodies.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits.
4. Avoid any contamination of the reagents of the Kit.
5. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Substrate must be handled with care, it is very sensitive to light and contamination
10. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.
11. Stop solution is a strong acid. Handle with care

III. STORAGE OF COMPONENTS

Plates and reagents must be stored between +2°C y +8°C.

IV. 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 turn over of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another.
- 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.
- Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry more time than strictly needed.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

V. PREPARATION OF REAGENTS

• **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water (40 ml of concentrated solution and 960 ml of water). Once ready this solution remains stable at +4°C.

• **Control Sera, Diluent and Conjugate:**

All these components are ready to use. Do not dilute.

VI. PREPARATION OF SAMPLES:

The sera samples need to be at 1/100 dilution (i.e. 5µl of serum with 495 µl of diluent)

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add samples diluted as it's specified in the previous instructions to the wells of the plate. Add 100 µl of positive and negative control serum. We recommend running samples and controls in duplicate for confirmatory purposes. Incubate the plate for 1 hour at 37°C ± 1°C
3. Wash 4 times following the described procedure.
4. Add 100 µl of conjugate to each well. Incubate the plate for 1 hour at room temperature (+18-25°C).
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for 10 min at room temperature.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well with a spectrophotometer at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

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

A. Validation of the test:

The test is considered valid when:

- The ratio:

$$\frac{\text{OD Negative Control}}{\text{OD Positive Control}} < 0.2$$

- OD of positive control ≥ 1

B. Interpretation of the results:

Calculate the ratio: S/P

$$\frac{\text{Sample OD}}{\text{Positive control (OD)}}$$

- Samples with S/P values ≥ 0.2 are positive for antibodies to influenza A viruses.
- Samples with S/P values < 0,2 will be considered negatives in antibodies to Influenza A viruses

C. Titer of the samples:

The titer of a sample must be calculate as follow:

$$T(\text{Titer}) = 2222 \times [(S/P)^{1.93}]$$

D. Example:

OD Negative control = 0.050

OD Positive control = 1.708

OD Sample = 0.543

Validation = 0,050 / 1,708 = 0,029 (< 0.2)

SP ratio = 0,543 / 1,708 = 0,318

Sample titer = 2222 x (0.318^{1.93}) = 244

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA,
S.A.
Av.de la Institución Libre de Enseñanza 39,
8ª planta
28037- MADRID (SPAIN)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in by:

