

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

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.  
C/ Hnos. García Noblejas, 39  
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:



## INGEZIM INFLUENZA PORCINA

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

Última revisión / Last revision: 15-10-13

COMPOSICION DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo	2 placas (T)		5 placas (T)	
	2 plates (Strip)		5 plates (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 (100x concentrado) Vials with conjugate (100x concentrated)	1	350 µl	2	350 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with washing solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente (DE01-05) 5x concentrado Bottles with diluent 5x concentrated (DE01-05)	1	100 ml	1	100 ml
Frascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate buffer (TMB)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with stop solution	1	60 ml	1	60 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT  
OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Agua destilada o desionizada  
Micropipetas de 5 a 200 µl.  
Puntas de micropipeta de un solo uso  
Dispositivos para lavado de placas.  
Probetas de 50-250ml  
Lector ELISA (filtro de 405 nm)

Distilled or deionised water.  
Micropipettes from 5 to 200 µl.  
Disposable micropipette tips.  
Washing plates device.  
Test tubes from 50 to 250 ml  
ELISA Reader (405 nm filter)

**Preparation of the conjugate (to be prepared immediately before its use):**

Dilute 1/100 the required volume of conjugate with the diluent provided in the kit (DE02):

→The necessary and sufficient amount of conjugate for a complete plate is: 110 µl of conjugate with 10.9 ml of diluent.

→The necessary and sufficient amount of conjugate for an 8 well strip is: 10µl of conjugate with 990 µl of diluent.

*Shake the solution well before use. Dilute only the volume of conjugate necessary to run the test, as the remaining solution must be discarded.*

**VI. PREPARATION OF SAMPLES:**

Sera samples must be assayed at 1/100 dilution (i.e. 5µl of serum with 495 µl of diluent)

**VII. TEST PROCEDURE**

- Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (22-25°C) (except conjugate).
- Add the samples, diluted as specified in the previous instructions, to the wells of the plate. Add 100 µl of the positive and negative control serum to their respective wells. We recommend running samples and control in duplicate. **Incubate the plate for 1 hour at 37°C.**
- Wash 4 times following the procedure previously described.
- Add 100 µl of the conjugate (prepared according to the previous instructions) to each

well. **Incubate the plate for 1 hour at room temperature (+18-25°C).**

- Wash 5 times following the procedure previously described.
- Add 100 µl of the substrate to each well. Keep the plate in darkness for **10 min at room temperature.**
- Add 100 µl of the stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the 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  $\geq 1$

**B. Interpretation of the results:**

Calculate the ratio: S/P

Sample OD

Positive control (OD)

- Samples with S/P values  $\geq 0,2$  are positive to antibodies to influenza A viruses.
- Samples with S/P values  $< 0,2$  are considered negative to antibodies to Influenza A viruses.

**C. Titer of the samples:**

The titre of a sample must be calculate as follows:

$$T(\text{Titter}) = 2222 \times [(S/P)^{1,93}]$$

**D. Example:**

OD Negative control = 0,162  
OD Positive control = 1,111  
OD Sample = 0,921

Validation =  $0,162 / 1,111 = 0,145 (< 0,2)$   
SP ratio =  $0,921 / 1,111 = 0,829$   
Sample titre =  $2222 \times (0,829^{1,93}) = 1547$

## I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). The technique is briefly described below:

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

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

The development of colour indicates the presence of antibodies against the virus in the swine sera, whilst the absence of colour absence of colour means that the sample is negative to specific antibodies.

## II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (20°-25°C) prior to use.
3. Do not mix reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
7. Use a new tip for each serum sample.
8. The substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination.
9. Systematically include a positive control and a negative serum each time the assay is run.
11. The stop solution is a strong acid and therefore must be handled 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 can be done using an automatic plate washer 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 instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.

- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

## 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:**

Control sera are ready to use. Do not dilute

### **Diluent:**

Dilute one part of the concentrated diluent with 4 parts of distilled or deionized water (100 ml of concentrated and 400 ml of water). Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C

## 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. 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.
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
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.
- las contaminaciones. Retirar del rasco 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.
- 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 (diluir en un tubo 5 µl de suero hasta 0,5 ml con diluyente una vez preparado según apartado VI).

## 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 H<sub>2</sub>O). Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- **Diluyente(5X)**  
Diluir 1 parte del diluyente DE01-05 con 4 partes de agua destilada. Por ejemplo, diluir los 100 ml de DE01-05 con 400 ml de agua destilada. El diluyente así preparado es estable a 4°C al menos hasta la caducidad del kit.
- **Sueros Control (+) y (-):**  
Los controles se presentan listos para su uso. No es necesaria preparación alguna. Añadir 100 µl de cada control a los pocillos correspondientes.
- **Conjugado (100X)**  
Hacer una dilución 1/100 en diluyente . Se recomienda diluir únicamente el volumen que vaya a ser utilizado ya que la solución sobrante ha de ser desechada: (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente es suficiente para una placa y 10 µl en 990 µl de diluyente es suficiente para una tira)

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente..
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 hacerlas por duplicado. **Incubar 1 hora a 37°C.**
3. .Lavar 4 veces según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado/pocillo preparado según se indica en punto VI.
5. Tapar la placa e incubar a **1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).**
6. Lavar 5 veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
7. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Mantener la reacción durante **10 minutos a temperatura ambiente.**
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispuso el sustrato.
9. 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:

Para que el test se considere válido, ha de cumplirse:

- Que el valor de DO media de los pocillos de control negativo sea como máximo 0.2 veces el valor de DO media de los pocillos del suero control positivo:

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

- El valor de DO del control positivo debe ser  $\geq 1$

### 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 (CP):

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

- 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:

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

### D. Ejemplo:

Abs Control Negativo = 0.162  
 Abs Control Positivo = 1.111  
 Validación = 0.162 / 1.111 = 0.145 (< 0,2)  
 Abs media de la muestra = 0.921  
 Relación M/P= 0.921 / 1.111 = 0.829  
 Título muestra=2222x(0.829<sup>1.93</sup>)= 1547