



INGEZIM INFLUENZA A

Prod Ref: 1.0.FLU.K3

Ensayo inmunoenzimático de competición para la detección de anticuerpos específicos frente al virus Influenza Tipo A en muestras de suero de aves, cerdo y caballo.

Blocking immunoenzymatic assay for detection of antibodies specific of *Influenza A virus* in birds, porcine and equine serum samples.

Última revisión / Last revision: 03-05-17 (English version: 30-08-16)
Registrado en España con nº: / Registered in Spain with nº: 1058 RD



COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (T) 2 plates (Strip)		5 placas (T) 5 plates (Strip)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 8x12 pocillos 96 Well microtitration plates (divides in 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de Control Positivo inactivado Vials of inactivated Positive Control	1	1 ml	2	1 ml
Viales de Control Negativo inactivado Vials of inactivated Negative Control	1	1 ml	2	1 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 (DE01-1) (a la dilución de uso) Bottles with serum diluent (DE01-01) ready to use	1	125 ml	1	125 ml
Fascos de Sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	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
OTHER MATERIALS AND REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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 450 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 (450 nm filter)

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de bloqueo (**ELISA de bloqueo**), 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 a testar junto con un anticuerpo monoclonal específico, en el caso de que el suero problema contenga anticuerpos frente al virus, estos se unirán a él imposibilitando la unión del monoclonal, mientras que si el suero problema carece de dichos anticuerpos,

será el monoclonal el que se una al antígeno fijado en la placa.

Tras eliminar todo el material no adherido a la placa mediante sucesivos pasos de lavado, podremos revelar la presencia o ausencia de monoclonal marcado, añadiendo el 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 ausencia de anticuerpos específicos frente al virus en el suero ensayado y la ausencia de color, la presencia de anticuerpos.

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 utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Usar únicamente agua destilada para la reconstitución de los reactivos.
10. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
11. 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. La solución de frenado es un ácido. Manipular con precaución.

III. CONSERVACIÓN DEL KIT

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

Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante un periodo máximo de un mes. De no utilizarse completamente en dicho periodo, es preferible distribuirlos en alícuotas y congelarlos para posteriores utilizaciones.

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 infectivos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado. Tras el lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Las muestras deben ser sueros. Para su uso en el kit, deberán diluirse 1/2 en el diluyente proporcionado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo 50µl de diluyente y 50µl de muestra.

VII. PREPARACION DE REACTIVOS:

• Solución de lavado:

Diluir una parte de la Solución de Lavado 25x concentrada, en 24 partes de agua destilada. Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

• Sueros Control (+) y (-):

Los controles deberán tratarse del mismo modo que las muestras, es decir para su ensayo

deberá realizarse la dilución 1/2 en el diluyente suministrado. Esta dilución puede realizarse directamente sobre el pocillo de la placa dispensando 50 µl de diluyente y 50 µl de suero.

¡ATENCIÓN! Una vez abiertos, los sueros controles, permanecerán estables durante 1 mes ente +2°C y +8°C. Si se requiere alargar estos periodos, recomendamos distribuirlos en alícuotas y almacenarlos hasta su uso a -20°C.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de iniciar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Si se realiza la dilución en el mismo pocillo, añadir en primer lugar 50µl de diluyente y a continuación 50 µl de las muestras y controles. De este modo obtendremos una dilución de los sueros 1/2. Agitar suavemente para una correcta homogenización de la mezcla, teniendo precaución de que no se produzca trasvase de unos pocillos a otros. Se recomienda ensayar los controles por duplicado. **Sellar la placa e incubar 1 hora a 37°C.**
3. Lavar 4 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir en cada pocillo 100 µl de conjugado. Sellar la placa e **incubar 30 minutos a 37°C.**
5. Lavar 5 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato a cada pocillo. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para mayor rapidez y uniformidad Mantener la reacción durante **10 minutos a temperatura ambiente.**
7. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo siguiendo el mismo orden que se siguió para dispensar la solución sustrato.
8. Leer la DO de cada pocillo en un lector de ELISA a 450 nm en los 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 al menos 3 veces el valor de DO media de los pocillos del suero control positivo:

$$\frac{\text{DO control negativo}}{\text{DO control positivo}} \geq 3$$

B. Interpretación de resultados:

Existen dos formas de cálculo dependiendo de las necesidades:

• RESULTADOS EXPRESADOS COMO % DE COMPETICIÓN:

$$\% \text{ Competición} = 100 - \frac{\text{DO muestras}}{\text{DO control negativo}} \times 100$$

Aves:

- Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten porcentajes de competición mayores del 45 %.
- Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten porcentajes de competición inferiores al 40%.
- **Zona gris.** Se recomienda que las muestras con porcentajes de competición comprendidos entre el 40 y el 45% sean valorados de nuevo con otra muestra de suero obtenida 2 semanas después
- **Cerdos y caballos:**

- Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten porcentajes de competición mayores del 30 %.
- Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten porcentajes de competición inferiores al 30%.

Zona gris. Se recomienda que las muestras con porcentajes de competición comprendidos entre el 25 y el 35% de competición sean valorados de nuevo con otra muestra de suero obtenida 2 semanas después.

- **RESULTADOS EXPRESADOS COMO RATIO M/N**

$M/N = DO \text{ muestra} / DO \text{ control negativo}$.

Aves:

- Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten $M/N < 0,55$.
- Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten $M/N > 0,60$.
- **Zona gris.** Se recomienda que las muestras con M/N comprendidos entre 0,55 y 0,60 sean valorados de nuevo con otra muestra de suero obtenida 2 semanas después

- **Cerdos y caballos:**

- Las muestras de suero se considerarán positivas cuando presenten M/N menor de 0,70.
- Las muestras de suero se considerarán negativas cuando presenten M/N superior a 0,70.

Zona gris. Se recomienda que las muestras con M/N entre 0,65 y 0,75 sean valorados de nuevo con otra muestra de suero obtenida 2 semanas después.

I. TECHNICAL BASES OF THE KIT

The kit is based in the technique of blocking immunoenzymatic assay (Blocking ELISA) which is briefly described below:

Plates are coated with the antigen. After adding the sample to the well, if it contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on plate while if the sample does not contain specific antibodies they will not bind to the antigen.

If we add a specific monoclonal antibody against the viral antigen coated to the plate (conjugated with

peroxidase), it will compete with the antibodies in the serum. If the sera samples contain specific antibodies, they will not allow the binding of the conjugate to the antigen; whereas if it does not contain specific antibodies, the Mab will bind to the antigen on the plate. After washing the plate to eliminate all non-fixed material, presence or absence of labelled Mab can be detected by adding the substrate (TMB) which, in presence of the peroxidase, will develop a colorimetric reaction.

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 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. Avoid 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. For each utilisation of the Kit, positive and negative control must be tested in a systematic way.
10. Stop solution is a strong acid solution that must be used with precaution. In case of accidental contact with skin, wash gently with water.
11. Substrate must be handled with care, it is very sensible to light and contamination.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C. **Once opened**, control sera are stable for one month. In case that they are not going to be used in this period, we recommend to store them at -20°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 SAMPLES

Samples must be sera. To be used in the kit, they must be diluted ½ in diluent supplied in the kit. This dilution can be made directly in the well by adding 50µl of diluent and 50µl of sample.

VI. PREPARATION OF REAGENTS:

- **Washing solution:**
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water. When ready, this solution remains stable between +2°C and +8°C.
- **Positive and Negative controls:**
Controls must be tested as sample serum. Add 50µl of controls to the appropriate wells containing 50 µl of diluent.
¡ATTENTION! Once opened they are stable for one month between +2°C and +8°C. For long term storage, we recommend to make aliquots and store them at -20°C.

VII. TEST PROCEDURE

- All reagents except the conjugate must be brought to room temperature before use.
- If dilution of samples is going to be made directly in the well, add 50µl to the required wells and then, 50µl of controls and samples to the appropriated wells containing the diluent. Mix well contents to assure a perfect homogenization. Be careful to prevent cross-contamination. It is recommended to assay controls in duplicate. **Cover the plate with a lid and incubate at 37°C for 1 hour.**
- Shake out contents and wash 4 times as it is described previously.
- Add 100 µl of conjugate to each well. Cover the plate with a lid and incubate for **30 minutes at 37°C.**
- Shake out contents and wash 5 times as it is described previously.
- Add 100 µl of substrate to each well. The use of multichannel pipette is recommended to accurate time and uniformity. **Incubate at room temperature for 10 min.**
- Add 100 µl of stopping solution to each well in the same order and at the same speed as the substrate solution.
- Read the absorbance of each well using a ELISA reader with a filter of 450nm within 5 min. after the addition of stop solution.

VIII. READING AND RESULTS INTERPRETATION

A. Validation criteria:

The test is considered valid if:

$$\frac{\text{OD Negative Control}}{\text{OD Positive Control}} \geq 3$$

B. Results Interpretation:

There are two different ways for interpretation depending on the preferences:

- RESULTS EXPRESSED AS COMPETITION PERCENTAGE:**

$$\% \text{ Competition} = 100 - \frac{\text{OD Samples}}{\text{OD Negative Control}} \times 100$$

- Avian:**

- Samples will be considered positive if the percentage of competition is higher than 45 %.
- Samples will be considered negative if the percentage of competition is lower than 40%.
- In case of percentages between 40-45% a new evaluation is recommended with a new extraction after 2 weeks.

- Swine and Horse:**

- Samples will be considered positive if the percentage of competition is higher than 30 %.
- Samples will be considered negative if the percentage of competition is lower than 30%.
- In case of percentages between 25-35% a new evaluation is recommended with a new extraction after 2 weeks.

- RESULTS EXTRESED AS RATIO S/N**

$$S/N = \text{OD of the sample} / \text{OD of negative control}$$

- Avian:**

- Samples will be considered positive if the S/P < 0.55.
- Samples will be considered negative if the S/N > 0.60.
- In case of S/N between 0.55 y 0.60, a new evaluation is recommended with a new extraction after 2 weeks.

- Swine and Horse:**

- Samples will be considered positive if the S/N < 0.70.
- Samples will be considered negative if the S/N > 0.70.
- In case of S/P between 0.75 y 0.65, a new evaluation is recommended with a new extraction after 2 weeks.

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es

Distributed in

by:

