



# INGEZIM HAEMOPHILUS

Prod Ref: 11.HPS.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al HAEMOPHILUS PARASUIS (HPS) en suero de cerdo

Immunoenzymatic assay for the detection of antibodies against Haemophilus parasuis (HPS) in porcine serum

Última revisión / Last revision: 14/10/13  
2012-03-01

Nº de registro en España/Registration number in Spain: 1403 RD

## COMPOSICION DEL KIT

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag control (azul) 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with control Ag (Blue)	2	-
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en tiras con Ag de Hemophilus 96 Well microtitration strip plates divided in 12 strips of 8 wells each with Ag Haemophilus	2	-
Viales de suero Control Positivo listo para su uso Vials positive control serum ready to use	1	4 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	4 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	500 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml
Frascos de Diluyente 10x concentrado (DE00-10) Bottles with diluent 10x concentrated (DE00-10)	1	60 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) listo para su uso Bottles with Substrate ready to use	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	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.  
Micropipets from 5 to 200 µl.  
Disposable micropipette tips.  
Washing plates device.  
Test tubes from 50 to 250 ml  
ELISA Reader (405 nm filter)

## I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

El kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación se describe brevemente la técnica:

Las muestras de suero y controles se incuban en pocillos con antígeno de haemophilus y en pocillos con antígeno control. En el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de cerdo mediante un conjugado específico

marcado con peroxidasa. Tras un segundo lavado para eliminar el exceso de conjugado, se añade el sustrato cromógeno y se producirá una reacción colorimétrica que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro.

De esta manera, la presencia de color, indicará que el suero problema contiene anticuerpos frente a la enfermedad, mientras que la ausencia de color indicará la ausencia de anticuerpos en el suero ensayado.

## 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.

## III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C. ATENCIÓN: A esta temperatura la solución de frenado puede precipitar, si esto sucede, calentar a +37°C antes de utilizarla.

## IV. INFORMACION 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.
- 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 en el procedimiento
- Antes de eliminar el contenido del último 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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Realizar la dilución 1/50 en el diluyente suministrado (10 µl de suero en 0,49 ml, de diluyente).

## VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado :**

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada. (p.e. 40 ml de concentrado más 960 ml de agua).

- **Diluyentes :**

Diluir una parte de la solución concentrada en 9 partes de H<sub>2</sub>O destilada. Una vez preparado, la solución (1X) es estable durante 1 semana entre +2°C y +8°C.

- **Sueros Controles (+) y (-) :**

Los sueros controles vienen listos para su uso

- **Preparación del conjugado: a realizar inmediatamente antes de su utilización**

Realizar una dilución 1/100 en diluyente (110 µl de conjugado en 11 ml de diluyente, es la cantidad mínima necesaria por placa).

Agitar muy bien la solución antes de su utilización. Preparar el volumen necesario a utilizar ya que la solución sobrante ha de ser desechada.

- **Sustrato**

Esta listo para uso. No diluir

## VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) temperatura ambiente.
2. **Adición de muestras y controles:**
  - Situar las tiras conteniendo antígeno HPS en las columnas impares y las tiras control (azul) en las columnas pares. Mantener el resto de las tiras sin utilizar en la bolsa cerrada.
  - Hacer una representación esquemática de la placa y de la distribución de controles y muestra.
  - Dispensar 100µl de control positivo listo para su uso en los pocillos A1 y A2.
  - Dispensar 100µl de control negativo listo para su uso en los pocillos B1 y B2.
  - Dispensar 100µl de las muestras diluidas en los pocillos C1/C2, D1/D2, etc
3. Tapar la placa e incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente (23±2°C)**.
3. Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo.
5. Tapar la placa e incubar **30 minutos a temperatura ambiente (23±2°C)**
6. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
7. Añadir 100 µl de solución sustrato, Mantener la reacción **20 minutos a temperatura ambiente (23±2°C) y en oscuridad**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
8. Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. Se recomienda añadir este reactivo siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato. ¡ATENCIÓN! La solución de frenado, por contener detergente, puede formar espumas. Evitar dispensar burbujas en la placa pues podría afectar a la lectura de los resultados.
9. Leer a 405 nm en un lector de Elisa en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado. Si el lector está equipado con filtros de referencia, ajustarlo a 490nm. Leer antes de 15 minutos después de parar la reacción.

## VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Para cada muestra y control, restar el valor de DO obtenido en el pocillo control de la DO obtenida en el pocillo con antígeno de HPS.

Para obtener el índice de positividad de cada muestra, dividir la DO corregida de la muestra por la DO corregida del control positivo (+):

$$\begin{aligned} \text{DO corr Muestra} &= \text{DO}_{\text{AgHPS}} - \text{DO}_{\text{Ag Negativo}} \\ \text{DO corr C. Positivo} &= \text{DO}_{\text{AgHPS}} - \text{DO}_{\text{Ag Negativo}} \end{aligned}$$

$$\text{INDICE muestra} = \frac{\text{DO corr Muestra}}{\text{DO corr C. Positivo}}$$

### Validación

- El índice del control negativo es  $< 0,25$
- La DO corregida del control positivo es  $> 0,8$

### Interpretación

INDICE  $< 0,4$ : Muestra Negativa

INDICE  $\geq 0,6$ : Muestra Positiva

Entre 0,4 y 0,6: Muestras sospechosas. Se recomienda realizar una nueva extracción a las dos semanas y volver a testar.

## I. TECHNICAL BASIS

This is an immunoenzymatic assay for the detection of antibodies against Haemophilus parasuis (HPS) in porcine serum.

HPS is responsible for Glasse syndrome, a condition characterized by septicaemia which results in arthritis and meningitis. To date, 15 different serotypes have been identified with serotypes 1,5,10,12,13 and 14 being the most pathogenic.

The porcine serum samples and the controls are incubated in wells coated with HPS antigens (Ags) (odd columns), and in wells with a cell lysate (even columns) that serve as negative control. The antibodies (Abs) specific to HPS present in positive serum samples will bind to the Ags in the wells. After several washes to eliminate unbound

substances, a conjugate (an Ab coupled to an enzyme) targeted at the porcine Abs is added. After incubation, the excess of this conjugate is eliminated by a second wash and its attachment is revealed with a chromogenous substrate. Following this incubation, the enzyme, if present, reacts with the substrate and a green color develops. The reaction is stopped and the optical densities are read. The intensity of the colour allows the determination of the type of sample tested. A negative sample will show a weak reaction (pale green) whereas a strong positive will show a strong reaction (dark green). All shades of green between dark and pale represent various degrees of positivity.

## II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use 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. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.
10. Substrate and stop solution must be handled with care.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

All reagents and components must be stored between +2°C and +8°C. WARNING: Stop Solution may precipitate at this temperature, if it happens, warm up at +37°C before use.

## 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 SAMPLE

Samples and controls need to be tested as duplicate.

Dilute porcine serum samples at 1/50 in 1X serum diluent (e.g., 10µl sample in 490 µl 1x serum

diluent). Make sure you use a new tip for each sample. Also make sure each dilution is properly mixed before being distributed into the wells.

## VI. PREPARATION OF REAGENTS

- **Washing solution:**  
Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water (i.e. 40 ml of concentrate with 960 ml of water).
- **Preparation of Diluent:**  
Supplied diluent is 10x concentrated. Before using it, a 1/10 dilution must be done with distilled or deionized water (1 vol. of concentrated supplied Diluent with 9 volume of distilled water). When ready this solution remains stable between +2°C and +8°C.
- **Control sera:**  
Controls are supplied ready to use. Do not dilute
- **Preparation of the conjugate: to make immediately before use.**  
Dilute the needed quantity of conjugate provided in the kit 1/100 into diluent:  
→ The necessary and sufficient quantity for a complete plate is 110 µl of conjugate with 10,9 ml of diluent.  
Shake very well the solution before the use. Prepare only the quantity needed for each time because the remainder volume has to be rejected.
- **Preparation of the substrate solution.**  
Substrate is supplied ready to use.

## VII. TEST PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature and mix well manually before use.

1. Put strips coated with HPS Ags on the odds columns of a frame, and strips without Ags (blue) on the even columns. Put the rest of the strips in the plastic bags included for that purpose.
2. Make a schematic representation of the plate and the distribution of controls and samples.
3. Dispenses 100 µl ready-to-use positive control into wells A1 and A2.
4. Dispenses 100 µl ready-to-use negative control into wells B1 and B2.
5. Dispenses 100 µl diluted samples into wells C1/C2, D1/D2.
6. Incubate at 23 ± 2°C for 30 minutes.
7. Wash each well with 4 times 300 µl 1X wash solution. (see section A). Throw away all liquid contained in the plate after each wash. After the last wash, dry the plate by tapping it on absorbent paper.
8. Dispense 100 µl diluted conjugate into each well.
9. Incubate at 23 ± 2°C for 30 minutes.
10. Repeat step 7.
11. Dispense 100 µl ready-to-use substrate into each well.
12. Incubate, away from light, at 23 ± 2°C for 20 minutes.
13. Dispense 100 µl ready-to-use stop solution into each well.
14. Measure optical densities (OD) at 405 nm. within 5 min after the addition of stop solution. If the microplate reader is equipped with a reference filter, set it a 490nm. The reading should be done no later than 15 minutes after the addition of the stop solution. Calculate the results.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

For each sample (S) and control, subtract the OD obtained in the well containing Ag (1) from the well without Ag (2). To obtain **Ratio**, divide each result by the one obtained for the positive control (P)

$$\text{RATIO} = \frac{(\text{ODs1}(\text{Ag}) - \text{ODs2}(\text{without Ag}))}{(\text{ODp1}(\text{Ag}) - \text{ODp2}(\text{without Ag}))}$$

### Validation

The following criteria must be met with in order to validate the analysis:

- Negative control ratio must be less than 0.25
- Positive control corrected OD must be greater than 0.8

### Interpretation

Sample ratio less than 0.4 is considered negative  
Sample ratio greater or equal to 0.6 is considered positive.

Sample ratio less than 0.6 but greater or equal to 0.4 is considered suspicious.

It is recommended to collect a 2<sup>nd</sup> serum sample 2 weeks later and test it.

Developed and manufactured by:



Packaged and distributed 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](mailto:ingenasa@ingenasa.com)  
[www.ingenasa.es](http://www.ingenasa.es)



IT-73840  
IT-73780



ISO 14001:2015  
9191.INGE



ISO 9001:2015  
9175.ING2