



CERTEST SWINE FLU

One step Influenza A card for the detection of Influenza type A from nasal human specimens and from nasal and tissue or stool pig specimens

INTENDED USE

The CerTest Swine Flu card is a one step coloured chromatographic immunoassay for the qualitative detection of Influenza type A antigens. It can be used directly with nasal swabs or nasal wash or nasal aspirate specimens from human and nasal swabs, lung lavage fluid, lung tissue or stool samples from pigs.

INTRODUCTION

Since swine influenza viruses were first isolated, they have become an economically important cause of respiratory disease in pigs throughout the world, and a human public health risk.

Swine influenza viruses are most commonly of the H1N1 subtype, but other subtypes are also circulating in pigs (e.g., H1N2, H3N1, H3N2). Pigs can also be infected with avian influenza viruses and human seasonal influenza viruses as well as swine influenza viruses. The H3N2 swine virus was thought to have been originally introduced into pigs by humans. Sometimes pigs can be infected with more than one virus type at a time, which can allow the genes from these viruses to mix. This can result in an influenza virus containing genes from a number of sources, called a "reassortant" virus.

Although swine influenza viruses are normally species specific and only infect pigs, they do sometimes cross the species barrier to cause disease in humans. These interspecies infections are most likely to occur when people are in close proximity to pigs, such as in swine production barns, livestock exhibits at fairs, and slaughterhouses.

The clinical signs/symptoms of influenza in pigs and people are remarkably similar, with fever, lethargy, lack of appetite and coughing prominent in both species.

PRINCIPLE OF THE TEST

The CerTest Swine Flu card is a qualitative immunochromatographic assay for the determination of Influenza type A antigens. The membrane is pre-coated with mouse monoclonal antibodies, on the test band region, to recognize these antigens.

During testing, the sample is allowed to react with the coloured conjugate (anti-type A mouse monoclonal antibodies-red microspheres) which was pre-dried on the test. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the coloured particles migrate. In the case of a positive result the specific antibodies present on the membrane will capture the coloured particles. Different coloured lines will be visible, depending upon the type of antigens contents of the sample. These lines are used to interpret the result.

The mixture continues to move across the membrane to the immobilized antibody placed in the control band region, a GREEN coloured band always appears. The presence of this GREEN band serves as 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) as an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- CerTest Swine Flu card is intended for professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not use test devices if the aluminium pouch has been damaged during storage.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new swab must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human samples

- Nasal swab specimen: Collect specimen with a sterile swab. Process the swab as soon as possible after collecting the specimen.
- Nasal Wash or Aspirate specimen. Samples should be processed as soon as possible after collection. The samples can be stored in the refrigerator (2-4 °C) for 8 hours prior to testing.

Pig samples

- Nasal swabs: Collect specimen with a sterile swab. Process the swab as soon as possible after collecting the specimen.
- Lung lavage fluid: Saline in leak-proof sterile containers. The fluid can be stored in the refrigerator (2-4°C) for 8 hours prior to testing.
- Lung tissue macerated: Take some affected portions of lung tissue and triturate into a zip-lock plastic bag.
- Stool samples: Stool samples could be collected in clean containers. The assay should be done right after collection. The samples can be stored in the refrigerator (2-4 °C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed, and brought to room temperature before testing.

MATERIALS PROVIDED

- CerTest Swine Flu card tests
- Reagent B (Swine Flu)
- Testing tubes
- Sterile swabs
- Disposable pipettes
- Tissue/Stool collection tube with buffer
- Instructions for use

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

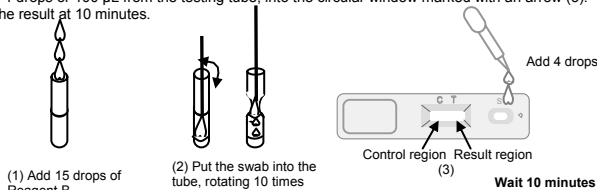
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

Allow the tests, swabs and controls to reach to room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open the package until ready to perform the assay. Only bring to room temperature the number of tests required to assay before opening it.

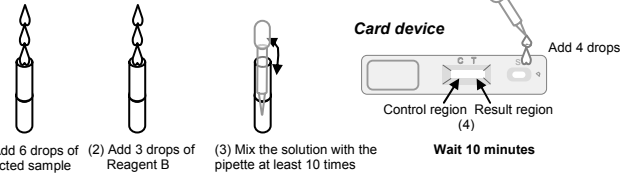
- Procedure A using nasal swab samples:

1. Add 15 drops or 450µl(1) Reagent B and immediately put the swab into the tube.
2. Mix the solution by rotating the swab forcefully against the side of the tube at least 10 times. Best results are obtained when the specimen is vigorously extracted in the solution (2). Extract as much liquid as possible from the swab, squeezing the sides of the tube as the swab is withdrawn. Discard the swab.
3. Remove the CerTest Swine Flu card device from its sealed bag just before using.
4. Place the test on a flat surface. Use a separate pipette and device for each sample or control.
5. Read the result at 10 minutes.



- Procedure B using nasal wash, aspirate samples and lung lavage pig sample:

1. Add 6 drops (1) of the nasal wash, aspirate samples or lung lavage sample with a pipette and 3 drops (2) of Reagent B in a testing tube.
2. Remove the CerTest Swine Flu card-device from its sealed bag just before using. Place the test on a flat surface.
3. Mix the solution with the pipette at least 10 times. Best results are obtained when the specimen is vigorously extracted in the solution (3).
4. Dispense 4 drops or 100 µL from the testing tube, into the circular window marked with an arrow (4).
5. Read the result at 10 minutes.



- (1) Add 6 drops of the collected sample
- (2) Add 3 drops of Reagent B
- (3) Mix the solution with the pipette at least 10 times

Wait 10 minutes

- Procedure C: using tissues and stool samples from pigs.

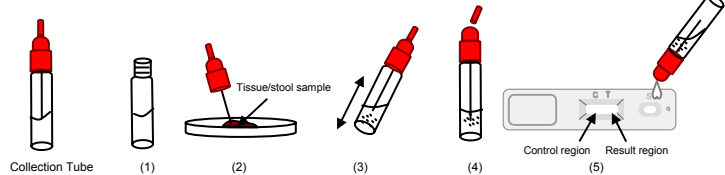
1. Take out the top of the tissue/stool collection tube (1).
2. **Tissue sample:** Take approximately 100mg triturate lung tissue and add it into the tissue/stool collection tube (2).

Stool sample: Use the stick to pick up a little sample (approx. 100mg), if the stool sample was liquid take 100 µL using a pipette, and add the sample into the stool collection tube (2).

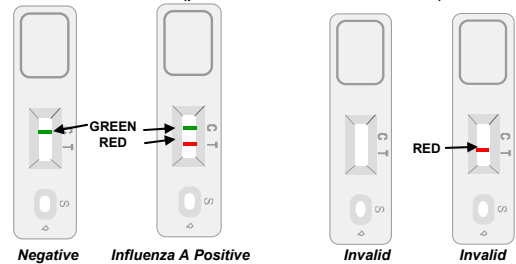
3. Close the tube with the buffer and sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).
4. Remove the CerTest Swine Flu card-device from its sealed bag just before using.
5. Cut the end of the top (4). Use a separate tissue/stool collection tube and device for each sample or control. Dispense exactly 4 drops or 100 µL into the circular window marked with an arrow, avoiding to add solid particles with the liquid (5).

In case the tests did not run due to solid particles fallen into the round window, stir the sample added or dispense a drop of extraction buffer until seeing the liquid running through the reaction zone.

7. Read the result at 10 minutes (the coloured bands appear)



INTERPRETATION OF RESULTS (please refer to the illustration below)



NEGATIVE: Only one GREEN band appears across the central window in the site marked with the letter C (control line).

Influenza A POSITIVE: In addition to the GREEN control band, a RED band (type A test line) also appears in the site marked with the letter T (results lines).

INVALID: A total absence of the control coloured band (GREEN) regardless of the appearance or not of the result line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are the most likely reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the test with a new test. If the problem persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured band in the result line region (T) will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value, nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. A green line appearing in the control region (C) is the internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours of opening the sealed pack.
2. This test provides a presumptive diagnosis for Influenza A infections. A confirmed infection diagnosis should only be made by a physician/veterinarian after all clinical and laboratory findings have been evaluated.
3. A negative result may be obtained if the specimen is inadequate or antigen concentration is below the sensitivity of the test. Therefore, it is recommended that all negative CerTest Swine Flu test results undergo confirmatory testing using other method and/or by cell culture.

PERFORMANCE

Sensitivity

Different virus extract dilutions were tested directly in the sample diluent or spiked in a negative specimen in accordance with the kit instructions.

The detection of Influenza type A with CerTest Swine Flu test showed >99% of sensitivity compared with another commercial rapid test.

Specificity

The use of mouse monoclonal antibodies in the elaboration of CerTest Swine Flu test assures high degree of specificity for the detection of Influenza type A antigens.

The detection of Influenza type A with CerTest Swine Flu test showed >99% of specificity compared with another commercial rapid test.

REFERENCES

1. Daniel E. Noyola, et al. Comparison of a New Neuraminidase Detection Assay with an Enzyme Immunoassay, Immunofluorescence, and Culture for Rapid Detection of Influenza A and B Viruses in Nasal Wash Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2000, p. 1161-1165 Vol. 38, No. 3
2. Newman A.P. et al. Human Case of Swine Influenza A (H1N1) Triple Reassortant Virus Infection, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, Sept 2008, Vol 14, No. 9, pp1470-1472
3. Donruehthai Sreta et al. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weaning pigs: an experimental trial *Virology Journal*, 2009, Vol 6, No 34.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Consult instructions for use		Catalogue number
	Keep dry		Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation		Manufacturer
	Use by		For IVD performance evaluation only



Maria de Luna 11, nave 16
E-50018 Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es



USO PREVISTO

CerTest Swine Flu card es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa de antígenos de Influenza tipo A. Puede usarse directamente con hisopos nasales o muestras de lavado o aspirado nasal para muestras humanas y para muestras de cerdo a partir de hisopos nasales, fluidos de lavado del pulmón, tejido de pulmón o muestras de heces.

INTRODUCCIÓN

Desde que se aislaron por primera vez los virus de Influenza porcina (Gripe Porcina), han llegado a ser una de las causas más importantes de enfermedad respiratoria en cerdos en todo el mundo, y un riesgo de salud pública. Los virus de Influenza Porcina más comunes son del subtipo H1N1, pero también se dan otros subtipos en cerdos (por ejemplo, H1N2, H3N1, H3N2). Los cerdos pueden también ser infectados con virus de influenza aviar y virus humanos de influenza estacionales de la misma forma que por virus de influenza porcinos. El subtipo H3N2 porcino se pensó que había sido originalmente introducido en los cerdos a través del contagio por humanos. Algunas veces los cerdos pueden ser infectados con más de un tipo de virus al mismo tiempo, lo cual puede favorecer una mezcla de los genes de esos virus. Como resultado de esta mezcla puede originarse virus de influenza con genes provenientes de distintos orígenes, llamados virus recombinados.

A pesar de que los virus de influenza porcina son normalmente específicos de especie y solo infectan a la especie porcina, en alguna ocasión traspasan la barrera de especies y provocan la enfermedad en los humanos. Estas infecciones interespecies suelen ocurrir en personas cercanas a los cerdos, como en granjas de producción de cerdos, exhibiciones de ganado en ferias o en mataderos. Los síntomas de la enfermedad en cerdos y en personas son muy similares, cursando con fiebre, letargo, pérdida de apetito y tos fuerte en ambas especies.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest Swine Flu card es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la determinación de antígenos de tipo A de influenza. Previamente en la membrana del test se fijan anticuerpos monoclonales de ratón, en la zona de resultados, para reconocer este antígeno. Durante la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales de ratón anti-tipo A-microesferas rojas) previamente secados en el test. Este complejo avanza por capilaridad a través de la membrana del test. Para dar el resultado como positivo, aparecerán líneas de color en la zona de resultados de la membrana. La ausencia de esta línea sugiere un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de antígenos, la mezcla de conjugado va avanzando por la membrana hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color VERDE (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente y 2) que el flujo ha sido el apropiado; y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los tests si el envase que los contiene ha sido dañado durante su almacén.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Se debe usar cada vez un hisopo nuevo.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Muestras Humanas

- Muestras recogidas con un hisopo estéril a partir de la nariz. Procesar el hisopo tan pronto como sea posible tras la recogida de las muestras.
- Muestras de lavado o aspirado nasal. Muestras deberían ser procesadas tan pronto como sea posible tras su recolección. Las muestras pueden ser almacenadas en frío (2-4°C) durante 8 horas antes de testarlas.

Muestras de cerdo

- Muestras recogidas con un hisopo estéril. Procesar el hisopo tan pronto como sea posible tras la recogida de las muestras.
- Fluido de lavado de pulmón. Solución salina en contenedores estériles no permeables. El fluido puede ser conservado en frío (2-4°C) durante 8 horas antes de testarlo.
- Tejido de pulmón macerado. Tomar una muestra de alguna zona de tejido de pulmón afectado y triturar en una bolsa tipo zip-lock.
- Muestras de heces: las muestras de heces deben ser recogidas en envases limpios. La prueba debería realizarse rápidamente tras su recolección. Las muestras pueden almacenarse en frío (2-4°C) durante 1-2 días antes de testarlas. Para almacenar durante más tiempo, máximo 1 año, las muestras deberían congelarse a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y llevar a temperatura ambiente antes de utilizarla.

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest Swine Flu card
- Reactivo B (Swine Flu)
- Tubos de ensayo
- Hisopos estériles
- Pipetas de plástico desechables
- Tubo para dilución de muestras (tejido/heces) con diluyente
- Instrucciones de uso

MATERIALES NECESARIOS-NO SUMINISTRADOS

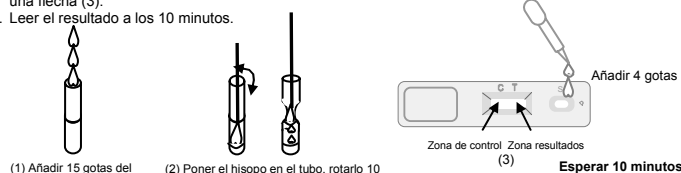
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, los hisopos y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30 °C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba y acondicionar sólo el número de tiras que se vayan a utilizar. Pasos a seguir:

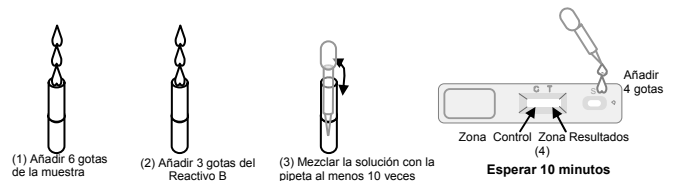
Procedimiento A usando muestra a partir de hisopo nasal:

1. Añadir 15 gotas o 450µL (1) del Reactivo B y poner inmediatamente el hisopo dentro del tubo.
2. Agitar haciendo rotar el hisopo contra las paredes del tubo para permitir que se mezcle la solución, al menos 10 veces. Se obtendrán mejores resultados si la muestra es extraída de forma vigorosa (2). Extraer la máxima cantidad del líquido del hisopo presionándolo contra las paredes del tubo. Tirar el hisopo.
3. Sacar el test CerTest Swine Flu de su envase en el momento antes de utilizarlo.
4. Colocar el test en una superficie plana. Usar la pipeta y un test diferente para cada muestra o control. Dispensar 4 gotas o 100 µL a partir del tubo de ensayo, en la ventana circular marcada con una flecha (3).
5. Leer el resultado a los 10 minutos.



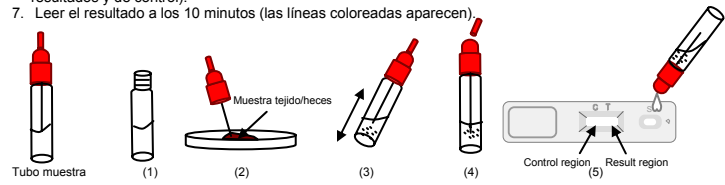
Procedimiento B utilizando lavados, aspirados nasales y muestras de lavado de pulmón del cerdo:

1. Añadir 6 gotas (1) del lavado, aspirado nasal o del lavado de pulmón del cerdo con la pipeta proporcionada con el test y añadir 3 gotas (2) del Reactivo B en un tubo de ensayo.
2. Sacar el test de su envase en el momento antes de utilizarlo. Colocar el test en una superficie plana.
3. Mezclar la solución con la pipeta unas 10 veces. Se obtienen mejores resultados si la muestra es extraída vigorosamente (3).
4. Dispensar 4 gotas o 100 µL a partir del tubo de ensayo, en la ventana circular marcada con una flecha (4).
5. Leer el resultado a los 10 minutos.

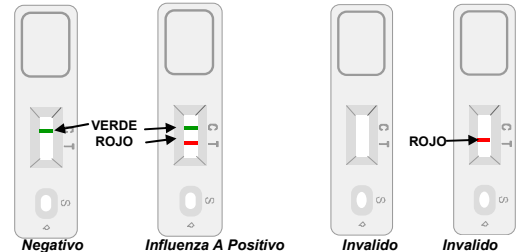


Procedimiento C utilizando muestras de tejido y muestras de heces a partir de cerdos:

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (tejido/heces) (1).
2. **Muestra de tejido:** tomar aproximadamente 100mg de tejido de pulmón triturado y añadirlo al tubo para dilución de muestras (2). **Muestra de heces:** con ayuda del palito se toma una muestra de las heces recogidas. Para ello se pasa el palito por la muestra recogiendo una pequeña cantidad de heces (aprox. 100mg), si la muestra fuera líquida se tomarán aprox. 100 µL de la misma con una pipeta, introducir la muestra en el tubo para dilución (2).
3. Cerrar el tubo y agitar para facilitar la dispersión de la muestra.
4. Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión (3). Cortar la punta del tapón (4).
5. Sacar el dispositivo de reacción CerTest Swine Flu Card de su envase para utilizarlo inmediatamente.
6. Para cada muestra o control se debe usar un tubo de dilución de la muestra y un dispositivo diferente. Tomar 4 gotas del líquido y depositarlas en la ventana circular marcada con una flecha o una S en el dispositivo, evitando añadir partículas sólidas con el líquido (5). Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas en la ventana circular, retirarlas y añadir una gota de tampón hasta que se vea avanzar al líquido (zona de resultados y de control).
7. Leer el resultado a los 10 minutos (las líneas coloreadas aparecen).



RESULTADOS



NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana central del dispositivo de reacción, en la zona marcada con la letra C (línea de control).
Influenza A POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA (línea de test tipo A) en la zona marcada con la letra T (línea de resultado).
INVALIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una cantidad insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo dispositivo de reacción. Si persistiese el problema, debe contactar con su proveedor y dejar de utilizar la prueba.

OBSERVACIONES

La intensidad de la línea de color rojo en la zona de resultado (T) del dispositivo de reacción variará dependiendo de la cantidad de antígenos presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígeno pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de control (C) es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto el envase individual el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Este test proporciona un diagnóstico de infección por Influenza A. Para confirmarlo deberían evaluarse por un especialista todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
3. Un resultado negativo puede aparecer si la muestra es inadecuada o la concentración de antígeno esta por debajo del límite de sensibilidad del test. Se recomienda que todos los resultados negativos se confirmen usando un método de cultivo.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad

Diluciones diferentes de fragmentos de virus Influenza A fueron probadas directamente en el diluyente de muestra o en muestras negativas para determinar la sensibilidad y especificidad de CerTest Swine Flu test.

La detección de Influenza tipo A con CerTest Swine Flu test obtiene >99% de sensibilidad en comparación con otro test rápido.

Especificidad

El uso de anticuerpos monoclonales de ratón en el diseño de CerTest Swine Flu test asegura un alto grado de especificidad para la detección de antígenos de Influenza tipo A. La detección de antígenos de Influenza tipo A con CerTest Swine Flu test obtiene >99% de especificidad en comparación con otro test rápido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daniel E. Noyola, et al. Comparison of a New Neuraminidase Detection Assay with an Enzyme Immunoassay, Immunofluorescence, and Culture for Rapid Detection of Influenza A and B Viruses in Nasal Wash Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2000, p. 1161-1165 Vol. 38, No. 3.
2. Newman A.P. et al. Human Case of Swine Influenza A (H1N1) Triple Reassortant Virus Infection, Wisconsin. Emerging Infectious Diseases, Sept 2008, Vol 14, No. 9, pp1470-1472
3. Donruehthai Sreta et al. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weaning pigs: an experimental trial Virology Journal, 2009, Vol 6, No 34.

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Número de lote
	Consultar las instrucciones de uso		Número de referencia
	Almacenar en lugar seco		Contiene <n> test
	Limitación de temperatura		Fabricante
	Fecha de caducidad		Evaluación de funcionamiento



CerTest María de Luna 11, nave 16
E-50018 Zaragoza (SPAIN)
BIOTEC S.L. www.certest.es

