



INgezim® PRRS Blue

Prod Ref: 11.PR3.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente al Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (cepas americanas y europeas) en suero y plasma de cerdo.

Enzymatic immunoassay for the detection and quantification of antibodies specific for porcine respiratory and reproductive syndrome virus (European and American strains) in swine serum and plasma.

Version Doc:07.06.2024

Nº de registro en España: 12003-RD

Registration number in Spain: 12003-RD



COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	2 Placas		5 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	2		5	
Viales de Conjugado de Peroxidasa, listo para usar	1	30mL	2	30mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 25x	1	125mL	1	125mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	30mL	1	60mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	60mL	1	60mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE35-01), listo para usar	1	60mL	2	60mL
Viales conteniendo Suero Control Negativo, listo para usar	1	4mL	2	4mL
Viales conteniendo Suero Control Positivo, listo para usar	1	4mL	2	4mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL 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 50-250 mL.
Lector ELISA (filtro de 650 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

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

Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno recombinante capaz de unirse a anticuerpos específicos tanto de cepas europeas como americanas del virus PRRS. Cuando sobre la placa se dispensa el suero problema, 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 añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica azul que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro a 650 nm.

En nuestro kit es de resaltar la utilización de antígeno viral obtenido por ingeniería genética, más concretamente por expresión de la ORF-7 procedente de aislados europeos y americanos. Esto garantiza la total ausencia de infectividad en cualquiera de los componentes del kit.

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 y evitar cualquier contaminación de los reactivos.
4. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
5. No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras ni pipetear los reactivos con la boca.
6. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
7. El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que se recomienda retirar del bote únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al bote.
8. La solución de frenado puede precipitar cuando se almacena a 4°C. Se debe comprobar y en caso de que existan precipitados, deberán disolverse antes de su uso.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

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 NaOH 0,1M, ya que las muestras problema podrían 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.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Realizar la dilución 1/40 en el diluyente DE35-01 suministrado (Por ejemplo 5 µL de suero + 195 µL de diluyente de suero, DE35-01).

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado:

Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40 mL de solución concentrada más 960 mL de agua destilada). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

Sueros Controles (+) y (-):

Los sueros controles se presentan listos para su uso. **No diluir.**

Conjugado:

El conjugado se presenta listo para su uso. **No diluir.**

Diluyente:

Se presenta listo para su uso. **No diluir.**

PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Añadir 100 µL de cada muestra a testar diluida como se ha descrito previamente. En último lugar añadir 100 µL de control positivo y control negativo. Con fines confirmatorios, se recomienda hacer duplicados de cada muestra y controles. Sellar la placa con la tapa adhesiva e incubar 30 min ± 2 a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).
3. Lavar 3 veces.
4. Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo. Sellar la placa e incubar 30 min ± 2 a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).
5. Lavar 5 veces.
6. Añadir a cada pocillo de la placa 100 µL de sustrato. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C). Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar lo más posible este proceso. Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo.
7. Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispensó el sustrato.
8. Leer los valores de absorbancia a 650 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realiza a una longitud de onda de **650 nm**. Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos absorbancias obtenidas ($\bar{X}$).

VALIDACIÓN DEL ENSAYO

El kit se considerará válido cuando:

- $CP \bar{X} - CN \bar{X} \geq 0,30$
- $CN \bar{X} \leq 0,30$

CÁLCULO DEL ÍNDICE DE POSITIVIDAD (M/P):

Para calcular el índice M/P realizar la siguiente operación

$$M/P = \frac{\text{Muestra A (650)} - CN \bar{X}}{CP \bar{X} - CN \bar{X}}$$

Los valores M/P negativos serán considerados con valor 0.

PUNTOS DE CORTE:

- Se considera una muestra como **positiva** si su índice M/P es igual o superior a 0,4
- Se considera una muestra como **negativa** si su índice M/P es menor de 0,4

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>2 Plates</i>		<i>5 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	2		5	
Vials with Peroxidase Conjugate, ready to use	1	30mL	2	30mL
Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125mL	1	125mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	30mL	1	60mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	60mL	1	60mL
Bottles with Diluent (DE35-01), ready to use	1	60mL	2	60mL
Vials containing Negative Control Sera, ready to use	1	4mL	2	4mL
Vials containing Positive Control Sera, ready to use	1	4mL	2	4mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Distilled or deionized water.
Micropipettes from 5 to 200 µL.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 mL.
ELISA Reader (650 nm filter)

TECHNICAL BASIS

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

The recombinant antigen, specific for antibodies of both European and American strains of PRRS virus, is fixed on polystyrene plates. When a serum sample contains specific antibodies against the virus, they will bind to the recombinant 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 at 650 nm.

Please note that our kit uses purified antigen obtained by the expression of the ORF7 from American and European strains of PRRS virus. This method warrants the total absence of infectivity in any of the components of the kit.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

1. Read the instructions of use carefully.
2. Bring all reagents to room temperature prior to use.
3. Do not mix instructions or reagents from different kits and avoid any contamination of the reagents.
4. Do not use components after expiration dates and do not mix components from different lots.
5. There should be no eating, drinking, or smoking where specimens or Kit reagents are being handled and do not pipette by mouth.
6. Use a new tip for each serum sample.
7. The substrate is extremely sensitive to light and contamination, so it is recommended to remove only the volume to be used and never return the excess substrate to the bottle.
8. The stop solution can sometimes precipitate when stored at 4°C. This must be checked, and precipitates must be dissolved before use.

STORAGE OF COMPONENTS

Keep all the reagents between +2°C and +8°C.

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 turnover of the plate to avoid the possible mixture of the content from one well to another. As a precaution, the wells should be emptied over a cuvette containing 0.1M NaOH solution, as the test samples may contain infectious agents.
- 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. After the washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate on dry.
- After the last step of washing shake the plate turned over an absorbent filter paper.

PREPARATION OF SAMPLES

Sera samples must be tested at 1/40 dilution in diluent DE35-01 (i.e.: 5 µL of serum + 195 µL of serum diluent DE35-01).

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 prepared this solution remains stable when stored at +4°C.

Control sera (+) and (-):

Both controls are ready to use. **Do not dilute.**

Conjugate:

This reagent is ready to use. **Do not dilute.**

Serum diluent:

This reagent is ready to use. **Do not dilute.**

TEST PROCEDURE

1. All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
2. Add 100 µL of samples diluted as it is 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. Seal the plate and incubate for 30 min ± 2 at room temperature (20°C to 25°C).
3. Wash 3 times.
4. Add 100 µL of conjugate to each well. Seal the plate and incubate for 30 min ± 2 at room temperature (20°C to 25°C).
5. Wash 5 times.
6. Add 100 µL of substrate solution to each well. Keep the plate at room temperature (20°C to 25°C) for 15 min. In order to speed up this process, it is advisable to use a multichannel pipette. Count the time since the first well had been filled.
7. Add 100 µL of stop solution to each well following the same order in which the substrate was added.
8. Read the OD at 650 nm within 5 min after the addition of stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

Measure and record the **A (650)** for samples and controls. Determine the arithmetic mean ($\bar{X}$).

VALIDITY CRITERIA:

- $CP \bar{X} - CN \bar{X} \geq 0.30$
- $CN \bar{X} \leq 0.30$

S/P RATIO CALCULATE:

The presence or absence of antibody to PRRSV is determined by calculating the S/P ratio for each sample

$$S/P = \frac{\text{Sample A (650)} - NC \bar{X}}{PC \bar{X} - NC \bar{X}}$$

Negative S/P values must be considered with value 0.

INTERPRETATION:

- Samples with a S/P **higher or equal** than 0.4 should be considered positive to PRRS antibodies.
- Samples with a S/P **lower** than 0.4 should be considered negative to PRRS antibodies.

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA
C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tlf: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



Distribuido en
Distributed in

por
by