



## INGEZIM PRRS DR

Prod Ref: 11.PRS.K0

Ensayo inmunoenzimático de doble  
reconocimiento para la detección  
temprana de anticuerpos frente al virus  
PRRS.

Double recognition enzymatic  
immunoassay for early detection of  
antibodies specific for PRRS virus

Última revisión / Last revision: 27-05-13

COMPOSICIÓN DEL KIT  
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)		2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.		
Placas antigenadas de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates ( 12 strips of 8 wells each)	5	-	2	
Viales de suero Control Positivo para PRRSV Vials of Positive Control serum for PRRSV	2	1.25 ml	1	1.25 ml
Viales de suero Control Negativo para PRRSV Vials of Negative Control serum for PRRSV	2	1.25 ml	1	1.25 ml
Frascos de Conjugado listo para su uso (proteína N-HRPO) Bottles with Conjugate ready to use (N protein-HRPO)	2	22 ml	1	22 ml
Frascos de Solución de Lavado concentrada 25x Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos conteniendo sustrato (TMB) a la dilución de uso Bottles with substrate (TMB) ready to use	1	60 ml	1	30 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 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 TÉCNICO DEL KIT

El kit ha sido diseñado para detectar anticuerpos específicos frente al virus PRRS y es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero o plasma de animales infectados y vacunados. **El kit ha sido desarrollado utilizando la proteína N de la cepa europea de PRRSV como antígeno. No obstante, debido a la similitud existente entre ambos tipos de cepas, el kit no debe ser utilizado para diferenciar entre las cepas europeas y americanas. Existen estudios que demuestran que el ensayo detecta algunos sueros de animales infectados con cepas americanas.**

La base técnica del kit, es un novedoso ensayo inmunoenzimático (ELISA) denominado de doble reconocimiento, cuyo fundamento se describe brevemente a continuación. Sobre una placa de poliestireno, se fija el antígeno de PRRS, en este caso la proteína recombinante N. Cuando se añaden las muestras de suero en el caso de contener anticuerpos

específicos, estos se unirán al antígeno. Si se añade simultáneamente las muestras de suero y la proteína N pero conjugada con peroxidasa., en el caso de que las muestras contuvieran anticuerpos frente a esta proteína, muchos de ellos serán capaces de capturar la N-peroxidasa a la vez que permanecen unidos a la N fijada en los pocillos. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa. Este ensayo de alta sensibilidad está especialmente recomendado para la detección temprana de anticuerpos específicos del PRRSV al estar favorecida la detección de IgM dada su alta sensibilidad y para la certificación de granjas negativas y la confirmación de animales negativos antes de su introducción en la granja.

Por otro lado, no se recomienda para el seguimiento de planes de vacunación dado los altos valores que se obtienen en todos los casos.

## 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, ni mezclar componentes de diferentes lotes.
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. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con agua abundante.
11. El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Por ello se recomienda retirar del bote la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y **nunca** devolver al bote el sustrato sobrante.

## III. INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DEL KIT:

Todos los componentes, deben ser almacenados en refrigeración (entre +2°C y +8°C), manteniéndose estables hasta la fecha de caducidad indicada. **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 utilizations.

## 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.
- ❖ Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- ❖ Agitar delicadamente 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.

## INGEZIM PRRS DR 11.PRS.K0

- ❖ 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.

### IV. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### ❖ Solución de lavado :

Diluir una parte de solución de lavado 25x concentrada, suministrada con el kit en 24 partes de agua destilada.

#### ❖ Sueros Controles:

Tratar como las muestras. Añadir 20µl / pocillo.

#### ❖ Preparación del conjugado:

Se presenta listo para su uso.

### V. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

Realizar una dilución 1/5 en el conjugado. Esta dilución puede hacerse directamente en el pocillo añadiendo en primer lugar 80 µl de conjugado listo para su uso y luego 20 µl de la muestra. Agitar suavemente para una correcta homogeneización de la mezcla.

### VI. PROCEDIMIENTO

- Equilibrar los componentes del kit a temperatura ambiente.**
- Adición del conjugado y los sueros:**
  - Añadir, en primer lugar, 80 µl del conjugado a cada uno de los pocillos que se vayan a utilizar.
  - Añadir 20 µl de cada muestra de suero/pocillo.
  - Añadir en último lugar los controles positivo y negativo (20 µl / pocillo).
  - Para una mayor seguridad en el resultado es recomendable valorar las muestras por duplicado
- Tapar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (22-25°C).
- Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
- IMPORTANTE: Lavar otras 3 veces con agua destilada.**
- Añadir a cada pocillo de la placa 100 µl de sustrato. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. (Contabilizar el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo).
- Añadir 100 µl de solución de frenado a cada pocillo. ATENCION: La solución de frenado ha de dispensarse en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
- Leer los valores de absorbancia a 450nm en los 5 min. siguientes a la adición de la solución de frenado.

### VII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el caso de que se hayan ensayado las muestras por duplicado, se considerará la media aritmética de los dos valores de DO obtenidos. Igualmente se realizará la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo y los dos pocillos para el control negativo.

#### 1. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

DO del Control Positivo > 1,4  
DO del Control Negativo < 0,25

---

## 2. CÁLCULO DE PUNTO DE CORTE

---

Punto de Corte = DO control positivo x 0.175

---

## 3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

---

Las muestras se considerarán **POSITIVAS** (presentan anticuerpos frente a PRRSV), cuando su DO a 450 nm sea superior al punto de corte.

Las muestras se consideraran **NEGATIVAS** (ausencia de anticuerpos frente a PRRSV), cuando

su DO a 450 nm sea igual o inferior al punto de corte

Dado que es un ensayo de máxima sensibilidad se recomienda que, tras la obtención de un positivo débil (cercano al punto de corte), se tome una nueva muestra del animal transcurridos 5-7. En caso de ser un animal recién infectado esta nueva muestra deberá ser claramente positiva.

**ATENCIÓN: El kit ha sido desarrollado utilizando la proteína N de la cepa europea de PRRSV como antígeno. No obstante, debido a la similitud existente entre ambos tipos de cepas, el kit no debe ser utilizado para diferenciar entre las cepas europeas y americanas.**

## I. TECHNICAL BASIS

---

The kit has been designed to detect antibodies specific for PRRS virus, being able to detect a very low titters of antibodies in sera of infected and vaccinated animals. **The kit has been developed using the European PRRSV N protein as antigen. Nevertheless, due to the homology existing between both kinds of strains, the kit must not be used to differentiate between American and European strains. There are studies showing detection of some sera from animals infected with American strains.**

The INGEZIM PRRS DR kit is based on a novel immunoenzymatic assay called double recognition ELISA which is described below:

Plates are coated with N protein of PRRSV.

When N protein conjugated with peroxidase is added and positive sera samples contain N protein specific antibodies, they will catch simultaneously the labelled N protein and the protein N fixed to the well. Presence or absence of labelled N protein will be detected by addition of substrate (TMB) which, in presence of the peroxidase, will develop a colorimetric reaction.

This is a very sensitivity assay and it is recommended for early detection after infection/vaccination of antibodies specific of PRRSV and for negative herds certifications and testing new animals before introduced. It is not recommended for survey of vaccinated animals because all OD values will be very high.

## 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. 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, control positive and negative serum 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 handle with care, it is very sensible to light and contamination.

## III. STORAGE OF COMPONENTS

---

All reagents and plates must be stored 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:

- 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 REAGENTS

### • **Washing solution:**

Dilute one part of the concentrate washing solution provided in the Kit with 24 parts of distilled or deionised water. Once prepared, this solution remains stable between +2°C and +8°C.

### • **Positive and Negative controls:**

Controls must be tested as samples (20µl / well).

### • **Preparation of the conjugate:**

Conjugate is ready to use and must be used adding 80µl/well

## VI. PREPARATION OF SAMPLES:

Sera samples must be assayed diluted 1/5 in conjugate. This dilution could be made directly on the assay plate by adding 80 µl of conjugate and 20 µl of sample to each well.

## VII. TEST PROCEDURE

- All reagents must be allowed to come to room temperature before use.
- Add in first place 80 µl of conjugate to each well and then add 20 µl of each sample to be tested.
- Add 20 µl of positive control and 20 µl of negative control to wells selected for this purpose.
- We recommend running controls and samples in duplicate. **Seal the plate and incubate 1 hour at room temperature.**
- Wash 3 times following the described procedure.
- IMPORTANT: Wash another 3 times with distilled or deionised water.**
- Add 100 µl of substrate, to each well. Keep the plate for **10 min at room temperature.**
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 min after the addition of stop solution.

## VIII. READING AND RESULT INTERPRETATION

Determine the mean absorbance of positive and negative controls and samples, in case of assayed the last ones in duplicate.

### 1. VALIDATION OF THE RESULTS

OD of Positive Control > 1,4  
OD of Negative Control < 0,25

### 2. CUT OFF CALCULATION

Cut Off = OD of positive control x 0.175

### 3. RESULTS INTERPRETATION

Samples will be considered **POSITIVE** (there are antibodies specific of PRRSV), if the OD value at 450nm is higher than the cut off.

Samples will be considered **NEGATIVE** (there are no antibodies specific for PRRSV in the sample) if the OD value at 450nm is equal or lower than the positive cut off.

Because this assay is highly sensitivity it is recommended with weak positive animals to take another sample 5-7 days after. If the animal is a recent infected, this samples will be a high positive.

**ATTENTION: The kit has been developed using the European PRRSV N protein as antigen. Nevertheless, due to the homology existing between both kinds of strains, the kit must not be used to differentiate between American and European strains.**

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: