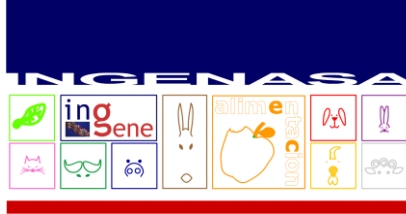


INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.



INGEZIM PRRS UNIVERSAL

Prod Ref: 11.PRU.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 de cerdo

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

Última revisión / Las revision: 03-06-14
Registrado por el MAPA nº 1053 RD



COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	2 placas (2x8x12 pocillos) 2 plates box (2x8x12 wells)		5 placas (5x8x12 pocillos) 5 plates box (5x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras 96 Well microtitration plates (divided into 12 strips of 8 wells each)	2	-	5	-
Viales de suero Control Positivo listo para su uso Vials positive control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de suero Control Negativo listo para su uso Vials negative control serum ready to use	1	4 ml	2	4 ml
Viales de Conjugado Peroxidasa 100x. Vials with peroxidasa conjugate 100x concentrated	1	350 µl	2	350 µl
Frascos de Solución de Lavado 25x concentrada Bottles with Washing Solution 25x concentrated	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Diluyente de suero (DE13-01) Bottles with serum diluent (DE13-01)	1	125 ml	2	125 ml
Frascos de Diluyente para conjugado (DE01-01) Bottles with conjugate diluent (DE01-01)	1	125 ml	1	125 ml
Frascos de Sustrato (ABTS) Bottles with Substrate (ABTS)	1	30 ml	1	60 ml
Frascos de Solución de Frenado Bottles with Stop Solution	1	65 ml	1	65 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

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. 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 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.

Con esta técnica, pretendemos facilitar y automatizar el diagnóstico de esta enfermedad, que hasta el momento viene realizándose por los ensayos de la Inmunoperoxidasa en Monocapas Celulares.

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, en E.Coli. Esto garantiza la total ausencia de infectividad en cualquiera de los componentes del kit..

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. Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
10. Tanto el tampón sustrato como la solución de frenado han de ser manipulados con precaución.
11. Para cada utilización del kit, preparar una solución de sustrato fresca.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C. ATENCION: 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. 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. PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Realizar la dilución 1/100 en el diluyente DE13-01 suministrado (5 µl de suero en 0,5 ml de diluyente de suero, DE13-01).

VI. PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución de lavado :**
Diluir una parte de solución concentrada en 24 partes de agua destilada (40ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- **Diluyentes :**
Ambos diluyentes vienen listos para uso. No diluir.
- **Sueros Controles (+) y (-) :**
Los sueros controles vienen a la dilución 1/100 listos para su uso, **NO DILUIR**
- **Preparación del conjugado: a realizar. Inmediatamente antes de su utilización.**
Realizar una dilución 1/100 en diluyente DE01-01

(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:**
Se suministra a dilución de uso

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit (excepto el conjugado) a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de suero control positivo a dos pocillos y 100 µl de suero control negativo en otros 2 pocillos. Añadir 100 µl de la dilución 1/100 de los sueros problema en el resto de los pocillos (con fines confirmatorios es recomendable hacer las muestras por duplicado). Tapar la placa e incubar 1 h a 37°C.
3. Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.
4. Añadir 100 µl de conjugado preparado según instrucciones anteriores a cada pocillo. Tapar la placa e incubar 45 minutos a Temperatura ambiente (18-25°C).
5. Lavar 5 veces la placa según procedimiento indicado.
6. Añadir 100 µl de sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción 15 minutos a temperatura ambiente. Se recomienda la utilización una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
7. 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.
8. Leer a 405 nm en un lector de Elisa en los siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Validación del test :

El test se considerara válido cuando el valor de DO a 405nm del control positivo sea superior a 1,5 y la del control negativo menor de 0,25.

Interpretación de resultados :

1. El cut off +/- es la DO (C+) multiplicado por 0,15. Las muestras con DO mayor a este valor se consideran positivas a anticuerpos para el virus PRRS. Las muestras con DO menores de éste valor serán consideradas negativas para PRRS.
3. El título de los sueros positivos, se determinará aplicando la siguiente fórmula :

$$\text{TITULO (Y)} = 100 (e^{4x}) - 80$$

En donde **e** es la base del logaritmo natural (2,718282) siendo **x** la S/P de la muestra.

Para determinar la relación S/P de la muestra se aplicará lo siguiente:

$$S/P = \frac{DO (muestra)}{DO (Control Positivo)}$$

EJEMPLO :

Suero	DO
Control (+)	2.343
Control (-)	0.182
Muestra "X"	0.910

1º Cálculo del CUT OFF

$$\text{CUT OFF} = 2,343 \times 0,15 = 0,351$$

3º Interpretación:

Muestra 1 → positiva (0,910 > 0,351)

4º Cálculo de la S/P de la muestra 1:

$$0,910 / 2,343 = 0.3884$$

5º Título de la Muestra "1"

$$(Y) = 100 (e^{4 \times 0,3884}) - 80 = 393$$

Todos los cálculos se pueden hacer utilizando la hoja de cálculo de Microsoft Excel.



I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). A brief description of the technique is given below:

The antigen is coated on polystyrene plates. When a sample serum contains specific antibodies against the virus, they will bind to the antigen adsorbed on the plate. After washing to eliminate all non-fixed material the presence of swine antibodies can be detected using a specific peroxidase conjugate. After addition of the substrate a colorimetric reaction will appear that can be measured by a spectrophotometer. The presence of colour indicates the presence of antibodies against the virus in the swine sera, and the absence of colours, the

absence of specific antibodies. The aim of this kit is to provide the users with a reliable and automatizable diagnostic technique for this disease, for which the immunoperoxidase monolayer assay and immunofluorescence had to be used till now.

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

The comparison assay made between this technique and the immunoperoxidase and immunofluorescence assays gives very satisfactory correlation levels.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the instructions for 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 expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each serum sample.
9. Substrate and substrate buffer must be handled with care.
10. For each utilisation of the Kit use a fresh substrate preparation.
11. For each utilisation of the Kit, positive and negative control sera must be tested in a systematic way.

III. STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2°C and +8°C.

WARNING! Stop Solution may precipitate, if this happens, warm the solution to +37°C prior to 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:

- 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.
- 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.

V. PREPARATION OF SAMPLE

Samples to be used in the assay must be porcine sera at **1/100 dilution in diluent DE13-01**

(i.e.: 5 µl of serum in 0,5 ml of serum diluent DE13-01).

VI. 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 960ml of water). Once ready this solution remains stable at +4°C.
- **Diluents:**
Both diluents are supplied ready to use. **Do not dilute.**
- **Control sera:**
Control sera are ready to use (1/100 dilution). **Do not dilute.**
- **Preparation of the conjugate: prepare immediately before use.**
Dilute 1/100 the required quantity of conjugate provided in the kit with diluent DE01-01 (e.g. 110 µl of conjugate into 11 ml of conjugate diluent is sufficient for one 96- well plate). Shake the solution thoroughly before use. Prepare only the quantity required for each use as any surplus solution will need to be discarded.
- **Substrat:**
Ready to use.

VII. TEST PROCEDURE

1. All reagents (except conjugate) must be allowed to reach room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive control to two wells of the plate, 100 µl of the negative control to another 2 wells and 100 µl of sera samples to the remaining wells of the plates (for the purpose of confirmation we recommend to run samples in duplicate wells). Seal the plate and incubate for 1 h at 37°C.
3. Wash 4 times following the procedure previously described.
4. Add 100 µl of conjugate, prepared following the previous instructions to each well. Seal the plate and incubate for 45 minutes at room temperature (20-25° C)
5. Wash 5 times following the described procedure.
6. Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate at room temperature for 15 minutes.
7. Add 100 µl of stop solution to each well.
8. Read the OD of each well at 405 nm within 5 min after the addition of stop solution.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Validation of the test:

The test is considered valid when positive control OD is higher than 1.500 and negative control OD is lower than 0.250.

Interpretation of the results:

1. CUTT OFF CALCULATION:

The cut off must be calculated as follows:

$0.15 \times \text{OD of positive control.}$

Samples with OD higher than cut off value should be considered positive to PRRS antibodies.

Samples with OD lower than cut off value should be considered negative to PRRS antibodies.

2. TITRE OF THE SAMPLE:

The titre of positive samples will be determined as follows:

- a) Calculate S/P

$$S/P = \frac{\text{Sample OD}}{\text{Positive Control OD}}$$

b) Titre is calculated as follows

$$\text{Titre} = 100 (e^{4x}) - 80$$

Where,

e is the natural logarithm base and **x** is the S/P of the sample.

EXAMPLE:

Serum	OD
Control +	2.343
Control -	0.182

Sample	OD
Sample "1"	0.910

1. **Validation:**

Positive control OD value = 2.343 (> 1.5)

Negative control OD value = 0.182 (< 0.25)

2. **Cut off calculation**

$$0.15 \times 2.343 = 0.351$$

$$\text{Sample OD} = 0.910 \rightarrow \rightarrow \text{positive}$$

3. **Titre of sample "1"**

a) $S/P (x)$

$$x = 0.910 / 2.343 = 0.3884$$

b) **Titre calculation:**

$$\text{Titre} = 100 (e^{4 \times 0.3884}) - 80 = 393$$

All calculations can be done using Microsoft Excel software

Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

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



Distributed in by: