

## **Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit for Oral Fluids**

**Kit de détection des anticorps dirigés contre le Virus du  
Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin à partir  
de fluides oraux**

**Kit para Detecção de Anticorpos Contra a Síndrome  
Reprodutiva e Respiratória Suína em Fluidos Oraís**

USO VETERINÁRIO.

**Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus  
del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino  
en Fluidos Orales**

**Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das PRRS  
Virus (Porcines Reproduktives und Respiratorisches  
Syndrom) in Speichelproben von Schweinen**

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.



## Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit for Oral fluids

For veterinary use only.

### Name and Intended Use

IDEXX PRRS OF is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in samples of swine oral fluid collected from individual pigs or composite samples from a pen of pigs\*.

### General Information

Porcine reproductive & respiratory syndrome virus (PRRSV) is an arterivirus that was first reported in both Europe and the US in the late 1980's as distinct strains with variable antigenicity<sup>1</sup>. The virus causes reproductive problems (abortions, weak piglets, failure to farrow, and sow deaths), respiratory disease (pneumonia, difficulty breathing, poor performance, and death) and mild neurologic signs. PRRS is considered to be one of the most economically significant diseases affecting the swine industry. An assessment of exposure to the PRRSV as a result of natural infection or vaccination is facilitated by a measurement of antibodies in serum or plasma. Recently, detection of antibodies in oral fluid samples of pigs is increasingly being used as a tool to monitor PRRS exposure in pigs<sup>2,3</sup>. It is important that the immunodiagnostic assay measuring the antibodies be sensitive to the different strains of the virus. For veterinary use only.

### Descriptions and Principles

IDEXX PRRS OF is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in samples of swine oral fluid. A microtitration format has been configured by coating recombinant PRRSV antigens on the plate. Upon incubation of the test sample in the coated well, antibody specific to PRRSV forms a complex with the coated antigens. After washing away unbound material from the wells, an anti-porcine:horseradish peroxidase conjugate is added that binds to any porcine antibody attached in the wells. Unbound conjugate is washed away and TMB substrate is added to the wells. Color development is then stopped using an acid stop solution, which turns the color from blue to yellow. The intensity of the color is proportional to the amount of bound specific antibodies against PRRSV present in the sample.

\*Claim for performance on pen samples is based on a study of 500 pigs divided into pens of 25 pigs each. Pigs vaccinated with modified live vaccine (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc.) 14 days prior to the day of the study (at peak of sero-conversion for antibodies) were introduced into pens of pigs sero-negative for PRRS antibodies at different prevalence of antibody-positive pigs (0%, 4%, 12%, 20%, and 36%), with 5 pens for each of the prevalence values. All pigs were bled for confirmation of serum antibody titers. Oral fluids were collected from each pen by hanging a cotton rope on the pen for 30 minutes; five successive 30-minute replicate collections were done per pen by hanging a separate new rope per collection event. PRRS antibodies were detected in at least 96% of all collection events at a prevalence of at least 20% sero-positive (vaccinated) pigs.

Reagents		Volume
1	PRRSV Antigen Coated Plate	5
2	Positive Control	1 x 4 mL
3	Negative Control	1 x 4 mL
4	Conjugate	1 x 60 mL
5	Sample Diluent	1 x 120 mL
A	TMB Substrate N.12	1 x 60 mL
B	Stop Solution N.3	1 x 60 mL
C	Wash Concentrate (10X)	1 x 235 mL
<b>Other Components:</b> Zip lock bag.		1

**Note:** see table at the end of the insert for a description of international symbols used on the labels of this kit.

### Materials Required but Not Provided

- Precision pipettes or multiple-delivery pipetting devices suitable for delivering 5 to 1000  $\mu$ L (reagents volumes listed in the “Test Procedure” require pipette precision less than or equal to 5%).
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well Microplate reader equipped with a dual 450nm and 650nm filter
- Distilled or deionized water
- Device for the delivery and aspiration of wash solution
- A trap for retaining aspirate and disinfectant
- Tubes for diluting samples

### Precautions and Warnings for Users

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- Store all reagents at 2–8°C. Bring the reagents to 18–26°C prior to use, and return to 2–8°C following use.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components.
- Do not use kits past their expiration dates and do not intermix components from kits with different serials.
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test.
- Unused microtiter wells should be stored sealed in a plastic bag with desiccant at 2–8°C.
- The two controls must be used for each test series.

## Sample Collection and Handling

Samples of oral fluids can be collected from individual pigs or collectively from pens using hanging ropes according to widely publicized methods available online or in the literature<sup>2,3</sup>.

## Warning

When testing oral fluids from pigs on transition diets in the first weeks after weaning, exercise caution upon interpreting results, as oral fluids from pigs feeding on diets supplemented with sprayed-dried plasma of porcine origin may test positive due to the presence of PRRSV antibodies in the porcine plasma supplement<sup>4</sup>.

## Laboratory Practices

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, or smoke where specimens or kit reagents are being handled.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional and national regulations.
- The Substrate solution is irritating to eyes, respiratory system, and skin. Avoid contact with skin and eyes.

## Preparation of Reagents

### Wash Solution

Determine the amount of Wash Solution needed for washing the microtiter plates. Dilute the Wash Concentrate (10X) 1:10 with distilled/deionized water (1 part concentrate with 9 parts water, e.g., 30 mL Wash concentrate (10X) + 270 mL distilled water). When prepared under sterile conditions (sterile water and sterile flasks or containers) this solution can be used during seven days when stored between 2–8°C.

### Preparation of samples

Dilute samples to be tested 1:2 with the Sample Diluent (e.g., by diluting 100  $\mu$ L of sample with 100  $\mu$ L of Sample Diluent). **Note:** Do not dilute controls. Be sure to change tips for each sample and record the position of each sample on the plate using a worksheet. Samples should be mixed prior to dispensing into the PRRSV coated wells.

## Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use then mixed by inverting and swirling. Use a separate pipette tip for each sample.

1. Obtain antigen-coated plate(s) and record the sample position.
2. Dispense 100  $\mu$ L of UNDILUTED Negative Control into two wells of the assay plate.
3. Dispense 100  $\mu$ L of UNDILUTED Positive Control into two wells of the assay plate.
4. Dispense 100  $\mu$ L of diluted samples into appropriate wells.
5. Cover the wells and incubate for 2 hours ( $\pm$ 5 min.) at 18–26°C.
6. Empty or aspirate liquid content from the microwells and wash each well with approximately 300  $\mu$ L of Wash Solution three to five times. Discard liquid contents of all wells after each wash. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of conjugate. Following the final fluid removal, gently, but firmly tap residual wash fluid from each plate onto absorbent material.

7. Dispense 100  $\mu$ L of Conjugate into each well.
8. Incubate for 30 minutes ( $\pm 2$  min.) at 18–26°C.
9. Repeat step 6.
10. Dispense 100  $\mu$ L of TMB Substrate N.12 into each test plate well.
11. Incubate for 15 minutes ( $\pm 1$  min.) at 18–26°C.
12. Dispense 100  $\mu$ L of Stop Solution N.3 into each well of the test plate to stop the reaction.  
Add the Stop Solution N.3 in the same order as the Substrate solution was added in step 10.
13. Measure and record the A(450 nm-REF) for samples and controls within 30 minutes of dispensing the Stop solution N.3. REF is the reference wavelength, which can be within the range of A(620 nm) to A(650 nm).
14. Calculate results.

## Results

For the assay to be valid, the following specifications must be met: the Positive Control mean minus the mean of the Negative Control ( $PC\bar{x} - NC\bar{x}$ ) must be greater than or equal to 0.150. In addition, the Negative Control ( $NC\bar{x}$ ) must be less than or equal to 0.150. For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the product insert. The presence or absence of antibody to PRRSV is determined by calculating the sample to positive (S/P) ratio. See Calculation section for examples.

**Note:** IDEXX has instrument and software systems available that calculate means and S/P and provide data summaries.

## Calculations

Examples:

Negative Control mean ( $NC\bar{x}$ )	$NC\bar{x} = \frac{NC1 A(450-REF) + NC2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0.064 + 0.08}{2} = 0.072$
Positive Control mean ( $PC\bar{x}$ )	$PC\bar{x} = \frac{PC1 A(450-REF) + PC2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0.560 + 0.596}{2} = 0.578$
Calculation for test sample	$S/P = \frac{Sample - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$	Sample = A(450-REF) = 0.750 $S/P = \frac{0.750 - 0.072}{0.578 - 0.072} = 1.34$

## Interpretation of Results

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

- If the S/P ratio is less than 0.40, the sample is classified as NEGATIVE for PRRSV antibodies.
- If the S/P ratio is greater than or equal to 0.40, then the sample is classified as POSITIVE for PRRSV antibodies.

## Summarized Test Procedure

IDEXX strongly recommends that you read the complete instructions carefully before using the test the first time.

Step	Action
<b>1. Preparation of Reagents</b>	Determine the amount of Wash Solution needed for washing the microtiter plates. Dilute the Wash Concentrate (10X) 1:10 with distilled/deionized water (1 part concentrate with 9 parts water, e.g., 30 mL Wash Concentrate (10X) + 270 mL distilled water).
<b>2. Preparation of Samples</b>	Dilute samples to be tested 1:2 with the Sample Diluent (e.g., by diluting 100 $\mu$ L of sample with 100 $\mu$ L of Sample Diluent).
<b>3. Sample Distribution</b>	Dispense 100 $\mu$ L of UNDILUTED Negative Control into two wells of the assay plate. Dispense 100 $\mu$ L of UNDILUTED Positive Control into two wells of the assay plate. Dispense 100 $\mu$ L of diluted samples into appropriate wells.
<b>4. Sample Incubation</b>	Cover the wells and incubate for 2 hours ( $\pm$ 5 min.) at 18–26°C.
<b>5. Washing the Plate</b>	Empty or aspirate liquid contents of all wells and wash each well with approximately 300 $\mu$ L of Wash Solution three to five times. Discard liquid contents of all wells after each wash. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of conjugate. Following the final liquid removal, gently, but firmly tap residual wash fluid from each plate onto absorbent material.
<b>6. Conjugate Distribution</b>	Dispense 100 $\mu$ L of Conjugate into each well.
<b>7. Conjugate Incubation</b>	Incubate for 30 minutes ( $\pm$ 2 min.) at 18–26°C.
<b>8. Repeat step 5</b>	
<b>9. Substrate Distribution</b>	Dispense 100 $\mu$ L of TMB Substrate N.12 into each test plate well.
<b>10. Substrate Incubation</b>	Incubate for 15 minutes ( $\pm$ 1 min.) at 18–26°C.
<b>11. Stop the reaction</b>	Dispense 100 $\mu$ L of Stop Solution N.3 into each well of the test plate to stop the reaction.
<b>12. Measure the plate</b>	Measure and record the A(450-REF) for samples and controls within 30 minutes of stopping the reaction. Calculate results.
<b>13. Interpretation</b>	If the S/P ratio is less than 0.40, the sample is classified as NEGATIVE for PRRSV antibodies. If the S/P ratio is greater than or equal to 0.40, then the sample is classified as POSITIVE for PRRSV antibodies.

## References

1. J. Zimmerman and K.-J. Yoon, Editors, The PRRS Compendium (second ed.), National Pork Board, Des Moines, IA (2003).
2. Kittawornrat A, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 24(2):262-9 (2012).
3. Prickett JR and Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *An Health Res Rev*, 11: 207-216 (2010).
4. Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the PRRSV oral fluid ELISA. *J Swine Health Prod* (in press).

## For technical assistance:

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website:[www.idexx.com/production/contact](http://www.idexx.com/production/contact)  
IDEXX Technical Support: 00 800 727 43399

\*IDEXX and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

©2013 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.



## Kit de détection des anticorps dirigés contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin à partir de fluides oraux

Réservé à l'usage vétérinaire.

### Définition et application

IDEXX PRRS OF est un test immunoenzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps dirigés contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (VSRPP/PRRSV) à partir d'échantillons de fluides oraux individuels ou de mélanges de fluides oraux obtenus sur un parc de porcs\*.

### Informations générales

Le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (VSRPP/PRRSV) fait partie de la famille des arterivirus et fut identifié respectivement en Europe et aux Etats-Unis vers la fin des années 80 comme souches distinctes de pathogénicité variable<sup>1</sup>. La maladie provoque des troubles reproductifs (avortements, porcelets faibles à la naissance, stérilité voir mortalité des truies) ou des troubles neurologiques modérés. SDRP est une maladie ayant un fort impact économique sur les élevages porcins: l'évaluation de l'exposition des troupeaux au virus suite à une infection naturelle ou suite à une vaccination est rendu possible grâce à la mesure du taux d'anticorps dans le sérum ou le plasma. La détection d'anticorps dirigés contre le PRRSV à partir d'échantillons de fluides oraux est une méthode de surveillance récente en plein développement<sup>2,3</sup>. Il est déterminant que le diagnostic employé pour mesurer les taux d'anticorps soit capable de détecter les différentes souches existantes du virus. Réservé à l'usage vétérinaire.

### Description et principe

IDEXX PRRS OF est un test immunoenzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps IgG dirigés contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV) à partir d'échantillons de fluides oraux. Les microplaques sont sensibilisées avec des antigènes PRRSV recombinants. Après incubation de l'échantillon à analyser dans les puits de la microplaque sensibilisée, les anticorps IgG spécifiques anti-PRRSV, s'ils sont présents, forment des complexes avec les antigènes viraux de la phase solide. Après élimination des substances non liées dans les puits par lavage, on ajoute un conjugué anti porcin IgG:peroxydase de raifort qui se lie à d'éventuels anticorps porcins fixés précédemment. Le conjugué non lié est ensuite éliminé par lavage, puis on ajoute le substrat TMB dans les puits. La réaction est alors stoppée en ajoutant la solution d'arrêt et la couleur passe du bleu au jaune. La densité de couleur qui se développe dans les puits est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-PRRS présent dans l'échantillon.

\*L'application sur échantillons de mélanges issues de parcs de porcs est basée sur une étude faite sur 500 porcs répartis en enclos de 25 animaux. Les porcs vaccinés avec un vaccin vivant modifié (Ingelvac PRRS MLV ®, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc) 14 jours avant le jour de l'étude (moment du pic de séroconversion pour les anticorps) ont été introduits dans des enclos de porcs séro-négatifs pour les anticorps SDRP pour reproduire des niveaux de prévalences différents (0%, 4%, 12%, 20% et 36%), avec 5 enclos pour chacune des valeurs de prévalence. Tous les porcs ont été prélevés pour la confirmation des titres d'anticorps sériques. Les fluides oraux ont été recueillis auprès de chaque enclos en passant une corde de coton pendant 30 minutes: cinq prélèvements successifs répétés toutes les 30 minutes ont été réalisés par enclos en passant une nouvelle corde pour chaque événement. Les anticorps SDRP ont été détectés dans au moins 96% de tous les échantillons à une prévalence d'au moins 20% de porcs séro-positifs (vaccinés).

Réactifs		Volume
1	Plaque sensibilisée avec des antigènes du PRRSV	5
2	Contrôle positif	1 x 4 ml
3	Contrôle négatif	1 x 4 ml
4	Conjugué	1 x 60 ml
5	Diluant des échantillons	1 x 120 ml
A	Substrat TMB N°12	1 x 60 ml
B	Solution d'arrêt N°3	1 x 60 ml
C	Solution de lavage concentrée (10X)	1 x 235 ml
<b>Autres composants:</b> sachet plastique hermétique réutilisable.		1

**Remarque:** voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles internationaux utilisés sur les étiquettes de la trousse.

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux capables de délivrer des volumes de 5 à 1000  $\mu\text{l}$  (la précision requise pour la mesure des volumes indiqués au « Mode Opérateur » doit être inférieure ou égale à 5%).
- Couvercles pour microplaques, aluminium ou adhésifs
- Cônes de pipettes à usage unique
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de microplaques équipé d'un filtre à 450 nm et d'un filtre de référence à 650 nm
- Eau distillée ou désionisée
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Système pour la collecte des solutions biologiques souillées
- Tubes de dilution pour échantillons

### Mises en garde et précautions d'emploi

- Des résultats optimaux seront obtenus en se conformant de manière stricte au protocole suivant. La précision du test dépend des éléments suivants: pipetage, minutage et lavage minutieux au cours de cette procédure.
- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à la lumière directe du soleil ou aux agents oxydants. Veiller à la propreté de la verrerie et/ou du matériel de laboratoire en matière plastique utilisés lors de sa manipulation.
- Stocker tous les réactifs au réfrigérateur à 2–8°C. Porter à 18–26°C avant utilisation et remettre au réfrigérateur à 2–8°C après utilisation.

- Éviter la contamination des composants du kit.
- Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption et ne pas mélanger les composants avec ceux de trousse ayant un numéro de lot différent.
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs.
- Les barrettes non utilisées doivent être conservées dans leur sachet plastique scellé au réfrigérateur à 2–8°C.
- Les contrôles positif et négatif doivent être inclus dans chaque série de tests.

## Prélèvement et manipulation

Les échantillons de fluides oraux peuvent être prélevés individuellement ou collectivement sur les porcs en utilisant des cordes suspendues selon les méthodes très bien décrites sur internet ou dans la littérature<sup>2,3</sup>.

## Avertissement

Lors de l'analyse de fluides oraux venant de porcs qui sont dans un régime de transition alimentaire (premières semaines après le sevrage), il faut faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats. Les fluides oraux de ces porcs nourris avec des suppléments pulvérisés de plasma séché d'origine porcine peuvent être testés positifs en raison de la présence d'anticorps SDRP dans certain plasma<sup>4</sup>.

## Pratiques de laboratoire

- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer pendant la manipulation des échantillons ou des réactifs contenus dans le kit.
- Tous les déchets doivent être correctement décontaminés avant leur élimination. Éliminer l'ensemble du matériel selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Le substrat est irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Éviter tout contact avec la peau et les yeux.

## Préparation des réactifs

### Solution de lavage

Porter la Solution de lavage concentrée (10X) à 18–26°C et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La Solution de lavage concentrée (10X) est à diluer au 1/10 dans de l'eau distillée ou déionisée (Exemple: 30 ml de Solution de lavage concentrée (10X) + 270 ml d'eau distillée par microplaque). La Solution de lavage reconstituée est stable pendant une semaine à 2–8°C.

### Préparation des échantillons

Diluer les échantillons à évaluer au 1/2 avec le Diluant des échantillons (à titre d'exemple, en diluant 100 µl d'échantillon dans 100 µl de Diluant des échantillons). **Remarque:** ne pas diluer les contrôles. Prendre soin d'utiliser un embout différent pour chaque échantillon et de préparer le plan de distribution des échantillons de la microplaque. Bien homogénéiser les échantillons préalablement à leur distribution dans les puits de la microplaque.

## Mode Opérateur

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien homogénéiser par agitation douce ou au vortex. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.

1. Réserver le nombre de microplaque(s) nécessaire(s) à la manipulation et établir le plan de distribution des échantillons.
2. Distribuer 100 µl de Contrôle négatif NON DILUÉ dans deux puits sur chaque microplaque.
3. Distribuer 100 µl de Contrôle positif NON DILUÉ dans deux puits de chaque microplaque.
4. Distribuer 100 µl d'échantillons pré-dilué dans le reste des puits.
5. Couvrir la microplaque et incuber à 18–26°C pendant 2 heures (±5 min.).
6. Vider ou aspirer les puits de la microplaque et laver chaque puits 3 à 5 fois avec 300 µl de la Solution de lavage. Eliminer le liquide dans les puits après chaque lavage. Ne pas laisser la plaque se dessécher entre les lavages et avant l'adjonction du Conjugué. Après élimination du dernier liquide de lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits en tapant doucement mais fermement chaque microplaque sur un papier absorbant.
7. Distribuer 100 µl de Conjugué dans chaque puits.
8. Incuber à 18–26°C pendant 30 minutes (±2 min.).
9. Répéter l'étape 6.
10. Déposer 100 µl de Substrat TMB N°12 dans chaque puits de la plaque.
11. Incuber à 18–26°C pendant 15 minutes (±1 min.) à l'abri de la lumière.
12. Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt N°3 dans chaque puits de la plaque pour arrêter la réaction. Ajouter la Solution d'arrêt N°3 dans le même ordre que le Substrat à l'étape 10.
13. Mesurer et enregistrer les DO des échantillons et les contrôles à A(450)-A(REF) dans les 30 minutes suivant la distribution de la Solution d'arrêt N°3. La longueur d'onde de référence (REF) se situe entre 620 et 650 nm.
14. Calculer les résultats.

## Résultats

Le test est validé si la différence entre la valeur moyenne de densité optique (DO) du Contrôle positif et la valeur moyenne de DO du Contrôle négatif ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) est supérieure ou égale à 0,150. De plus, la valeur moyenne de DO du Contrôle négatif ( $CN\bar{x}$ ) doit être inférieure ou égale à 0,150. La non-validation d'un test peut être liée à une erreur technique. Répéter le test en respectant strictement le protocole opératoire de la trousse. La présence ou l'absence d'anticorps anti-PRRSV est déterminée par le calcul du rapport E/P. Voir les exemples dans la section Calculs.

**Remarque:** IDEXX propose des instruments et des systèmes logiciels qui calculent les moyennes, les valeurs E/P et délivrent un récapitulatif des données.

## Calculs

Exemples:

Moyenne du Contrôle négatif ( $CN\bar{x}$ )	$CN\bar{x} = \frac{CN1 \text{ A}(450\text{-REF}) + CN2 \text{ A}(450\text{-REF})}{2}$	$\frac{0,064 + 0,08}{2} = 0,072$
Moyenne du Contrôle positif ( $CP\bar{x}$ )	$CP\bar{x} = \frac{CP1 \text{ A}(450\text{-REF}) + CP2 \text{ A}(450\text{-REF})}{2}$	$\frac{0,560 + 0,596}{2} = 0,578$
Rapport E/P	$E/P = \frac{\text{Echantillon A}(450\text{-REF}) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$	Echantillon = A(450-REF) = 0,750 $E/P = \frac{0,750 - 0,072}{0,578 - 0,072} = 1,34$

## Interprétation des résultats

La présence ou l'absence d'anticorps anti-PRRSV est déterminée par le calcul du rapport E/P.

- Si la valeur du rapport E/P est inférieure à 0,40, l'échantillon est considéré comme NÉGATIF en anticorps anti-PRRSV.
- Si la valeur du rapport E/P est supérieure ou égale à 0,40, l'échantillon est considéré comme POSITIF en anticorps anti-PRRSV.

## Résumé du Protocole

Avant la première mise en œuvre du test, il est vivement recommandé de lire l'ensemble du mode opératoire.

Etape	Action
<b>1. Préparation des réactifs</b>	Porter la Solution de lavage concentrée (10X) à 18–26°C et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La Solution de lavage concentrée(10X) est à diluer au 1/10 dans de l'eau distillée ou déionisée (Exemple: 30 ml de Solution de lavage concentrée (10X) + 270 ml d'eau distillée par microplaque).
<b>2. Préparation des échantillons</b>	Diluer les échantillons au 1/2 avec le Diluant des échantillons (à titre d'exemple, en diluant 100 µl d'échantillon dans 100 µl de Diluant des échantillons).
<b>3. Distribution des échantillons et des contrôles</b>	Distribuer 100 µl de Contrôle négatif NON DILUÉ dans deux puits de chaque microplaque. Distribuer 100 µl de Contrôle positif NON DILUÉ dans deux puits de chaque microplaque. Distribuer 100 µl d'échantillons pré-dilués dans le reste des puits.
<b>4. Incubation des échantillons</b>	Couvrir la microplaque et incuber à 18–26°C pendant 2 heures (± 5 min.).
<b>5. Lavage des plaques</b>	Vider ou aspirer les puits de la microplaque et laver chaque puits 3 à 5 fois avec 300 µl de la Solution de lavage. Eliminer le liquide contenu dans les puits après chaque lavage. Ne pas laisser la plaque se dessécher entre les lavages et avant l'adjonction du Conjugué. Après élimination du dernier liquide de lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits en tapant doucement mais fermement chaque microplaque sur un papier absorbant.
<b>6. Distribution du conjugué</b>	Distribuer 100 µl de Conjugué dans chaque puits.
<b>7. Incubation du conjugué</b>	Incuber à 18–26°C pendant 30 minutes (± 2 min.).
<b>8. Répéter l'étape 5</b>	
<b>9. Distribution du substrat</b>	Distribuer 100 µl de Substrat TMB N°12 dans chaque puits de la plaque.
<b>10. Incubation du substrat</b>	Incuber à 18–26°C pendant 15 minutes (± 1 min.) à l'abri de la lumière.
<b>11. Arrêt de la réaction colorimétrique</b>	Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt N°3 dans chaque puits de la plaque pour arrêter la réaction.
<b>12. Lecture de la plaque</b>	Mesurer et enregistrer les DO des échantillons et les contrôles à A(450)-A(REF) dans les 30 minutes suivant la distribution de la Solution d'arrêt.
<b>13. Interprétation</b>	Si la valeur du rapport E/P est inférieure à 0,40, l'échantillon est considéré comme NÉGATIF en anticorps anti-PRRSV. Si la valeur du rapport E/P est supérieure ou égale à 0,40, l'échantillon est considéré comme POSITIF en anticorps anti-PRRSV.

## Références

1. J. Zimmerman and K.-J. Yoon, Editors, The PRRS Compendium (second ed.), National Pork Board, Des Moines, IA (2003).
2. Kittawornrat A, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 24(2):262-9 (2012).
3. Prickett JR and Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *An Health Res Rev*, 11: 207-216 (2010).
4. Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the PRRSV oral fluid ELISA. *J Swine Health Prod* (in press).

## Pour plus d'informations:

Contactez votre représentant local IDEXX ou visitez: [www.idexx.com/production/contact](http://www.idexx.com/production/contact)  
IDEXX Technical Support: 00 800 727 43399

\*IDEXX et Test With Confidence sont des marques de commerce ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

© 2013 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

## Kit para Detecção de Anticorpos Contra a Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína em Fluidos Oraís

Para uso exclusivamente veterinário.

### Nome e Indicações

IDEXX PRRS OF é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de anticorpos contra o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (SRRS) em amostras de fluido oral que podem ser coletadas por animal ou por baias\*.

### Informações gerais

O vírus da SRRS é um arterivírus descrito pela primeira vez na Europa e nos EUA no final da década de 80 e que apresenta diferentes cepas de antigenicidade variável<sup>1</sup>. O vírus causa problemas reprodutivos (abortos, leitões fracos, incapacidade de levar a gestação a termo e morte da mãe), doenças respiratórias (pneumonia, dificuldade de respirar, mau desempenho e morte) e sinais neurológicos leves. A infecção pelo vírus da SRRS é considerada uma das doenças mais importantes do ponto de vista econômico na suinocultura. A dosagem sérica de anticorpos facilita a detecção da exposição ao vírus da SRRS, seja esta por infecção natural ou por vacinação. Recentemente, a detecção de anticorpos em fluidos orais de suíno é cada vez mais usada como ferramenta para monitorar a exposição o vírus da SRRS<sup>2,3</sup>. Os ensaios imunoenzimáticos para dosagem destes anticorpos devem ser capazes de detectar as diferentes cepas do vírus. Para uso exclusivamente veterinário.

### Descrição e Princípios

O kit de teste IDEXX PRRS OF é um ensaio imunoenzimático desenvolvido para detectar anticorpos contra o vírus da SRRS em amostras de fluidos orais de suíno. O teste consiste em um teste de microtitulação em placas impregnadas com antígenos do vírus SRRS. Inicialmente, a amostra a ser testada é incubada na cavidade impregnada e caso haja anticorpos específicos para o vírus da SRRS estes formam complexos com os antígenos da placa. Em seguida, as cavidades são lavadas para retirada do material não aderido e é adicionado um conjugado de anticorpo antissuíno:peroxidase de raiz forte (HRPO), que se liga ao anticorpo suíno aderidos às cavidades. Na próxima etapa, o conjugado que não se ligou ao antígeno é lavado e o substrato de tetrametilbenzidina (TMB) é adicionado às cavidades. Na presença da enzima, o substrato é convertido em um produto que reage com o cromógeno para gerar uma coloração azul. Após a adição da solução de Interrupção, uma coloração amarela é formada. O surgimento subsequente de cor varia de acordo com a quantidade de anticorpos contra SRRS existente na amostra.

\*A inserção de performance de amostragem por baía é baseada num estudo de 500 suínos divididos em baias com 25 suínos cada. Leitões vacinados com vacina viva modificada (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc.) 14 dias antes do dia de início do estudo (pico de soroconversão de anticorpos) foram introduzidos nas baias de leitões soronegativos para anticorpos para PRRS, a diferentes prevalências para anticorpos-positivos (pigs (0%, 4%, 12%, 20%, and 36%), sendo 5 baias para cada prevalência. Todos os leitões foram sangrados para confirmação de anticorpos, no soro. Fluidos orais foram colhidos de cada baía através da colocação de uma corda de algodão pendurada por 30 minutos. Foram realizadas cinco colheitas sucessivas durante 30 minutos em cada baía, sendo pendurada uma nova corda, separada, para cada evento. Anticorpos para PRRS foram detectados no mínimo 96% das colheitas, numa prevalência de no mínimo 20% dos leitões soro-positivo (vacinados).

Reagentes		Volume
1	Placa Impregnada com Antígeno de PRRS	5
2	Controle Positivo	1 x 4 ml
3	Controle Negativo	1 x 4 ml
4	Conjugado	1 x 60 ml
5	Diluyente de Amostra	1 x 120 ml
A	Substrato TMB No. 12	1 x 60 ml
B	Solução de Interrupção No. 3	1 x 60 ml
C	Concentrado de Lavagem (10X)	1 x 235 ml
<b>Outros componentes:</b> Embalagem zip		1

**Nota:** veja a tabela no final do protocolo para descrição dos símbolos internacionais usados nos rótulos dos kits.

### Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Pipetas de precisão ou sistemas de pipetagem múltipla adequados para pipetar de 5 a 1000  $\mu\text{l}$  (de acordo com o "Protocolo de Teste", os volumes exigidos para os reagentes requerem pipeta com precisão inferior ou igual a 5%).
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio ou adesivo)
- Ponteiros descartáveis
- Proveta graduada para a solução de lavagem
- Leitora de placas de 96 cavidades equipada com filtro de 650 nm com duplo comprimento de onda de 450 nm e 650 nm
- Água destilada ou deionizada
- Dispositivo para a distribuição e aspiração da solução de lavagem
- Dispositivo para retenção do aspirado e desinfetante
- Tubos para diluição

### Precauções e Advertências aos Usuários

- A Resultados ótimos serão obtidos seguindo-se rigorosamente o protocolo deste teste. Pipetagem cuidadosa, observação do tempo e lavado durante todo o procedimento são necessários para manter a precisão e acurácia.
- Não expor solução TMB à luz forte ou a quaisquer agentes oxidantes. Manipule a solução TMB com materiais de plástico ou vidro limpos.
- Armazene todos os reagentes entre 2–8°C. Deixar que atinjam 18–26°C antes do uso, e retornar a 2–8°C após o uso.
- Deve-se tomar cuidado para prevenir contaminação dos componentes do kit.
- Não utilize componentes com data de validade vencida nem misture componentes com números de série diferentes.
- Use somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste.
- Cavidades não utilizadas devem ser armazenadas seladas dentro da bolsa plástica a 2–8°C.
- Os dois controles devem ser usados para cada bateria de testes.



## Colheita de amostras e manueio

Amostras de fluidos orais podem ser colhidas individualmente por suino ou coletivamente por baia, pendurando-se uma corda de acordo com os métodos publicados online ou na literatura<sup>2,3</sup>.

## Cuidado

Quando testar fluidos orais de leitões em fase de transição alimentar, nas primeiras semanas depois do desmame, cuidado na interpretação dos resultados, porque fluidos orais de leitões alimentados com rações suplementadas com plasma spray-desidratado de origem suína podem resultar positivos no teste devido presença de anticorpos para PRRS no suplemento plasmático<sup>4</sup>.

## Práticas laboratoriais

- Não pipete com a boca.
- Não coma, beba ou fume onde as amostras ou kits reagentes estiverem sendo manuseados.
- Todos os resíduos devem ser descontaminados adequadamente antes do descarte. Descarte os conteúdos de acordo com as normas locais, regionais e nacionais.
- A solução Substrato causa irritação aos olhos, ao sistema respiratório e à pele evite contato com a pele e os olhos.

## Preparo dos reagentes

### Solução de Lavagem

O Concentrado de lavagem deve atingir 18–26°C e ser homogeneizado para dissolver quaisquer sais precipitados. O Concentrado de lavagem deve ser diluído 10 vezes (1/10) em água destilada ou deionizada antes do uso (p.ex. 30 ml de concentrado em 270 ml de água por placa de teste).

Quando a Solução de Lavagem é preparada em condições estéreis, pode ser armazenada durante uma semana a temperaturas entre 2–8°C.

### Preparo das amostras

Diluir as amostras 1/2 com o Diluente de Amostra (p. ex. para diluir 100  $\mu$ l de amostra, utilize 100  $\mu$ l de diluente). **Observação:** NÃO DILUA OS CONTROLES. Troque as ponteiros ao manusear amostras diferentes. As amostras devem ser homogeneizadas antes de serem colocadas na placa impregnada.

## Protocolo do teste

Os reagentes devem estar à 18–26°C antes do uso e devem ser homogeneizados através de inversão e movimentos circulares suaves. Use uma ponteira diferente para cada amostra.

1. Obter placa(s) impregnada(s) de antígeno e registrar a posição da amostra.
2. Distribuir 100  $\mu$ l de Controle Negativo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas, em duplicata.
3. Distribuir 100  $\mu$ l de Controle Positivo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas, em duplicata.
4. Distribuir 100  $\mu$ l da amostra diluída nas cavidades apropriadas, empregando uma ponteira diferente para cada amostra.
5. Cubra as cavidades e incubar por 2 horas ( $\pm$ 5 min.) à 18–26°C.
6. Esvaciar ou aspirar o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar bem cada cavidade (3 a 5 vezes) com cerca de 300  $\mu$ l de Solução de Lavagem. Remover o conteúdo líquido de todas as cavidades após cada lavagem. Evitar que as placas sequem entre as lavagens e antes da adição do conjugado. Após a remoção da Solução de Lavagem final, remover o líquido residual batendo cuidadosamente, porém com firmeza, a placa sobre material absorvente.
7. Distribuir 100  $\mu$ l de Conjugado em cada cavidade.

8. Incubar por 30 minutos ( $\pm 2$  min.) à 18–26°C.
9. Repetir a etapa 6.
10. Distribuir 100  $\mu$ l de Substrato TMB No. 12 em cada cavidade.
11. Incubar por 15 minutos ( $\pm 1$  min.) à 18–26°C.
12. Distribuir 100  $\mu$ l de Solução de Interrupção No. 3 em cada cavidade da placa de teste para interromper a reação. Adicione a Solução de Interrupção No. 3 na mesma ordem na qual a solução de substrato foi adicionada no passo 10.
13. Medir e anotar a absorvância a A(450nm-REF) para amostras e controles, dentro de 30 minutos após adicionar a Solução de Interrupção No. 3. REF e o comprimento de onda de referencia, que pode estar na gama entre A(620 nm) e A(650 nm).
14. Calcular os resultados.

## Resultados

O ensaio só será válido se forem atendidas as seguintes especificações; a média do controle positivo menos a média do controle negativo ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) deve ser igual ou superior a 0,150 e a média do controle negativo ( $CN\bar{x}$ ) deve se igual ou inferior a 0,150. Se o ensaio não for válido, a técnica pode estar incorreta ou pode ser necessário rever cuidadosamente as instruções fornecidas com o produto e repetir o teste. A presença ou não de anticorpos contra o vírus da SRRS é determinada calculando-se a relação amostra: positivo (A/P). A seção de cálculos apresenta alguns exemplos.

**Nota:** IDEXX Laboratories, Inc. têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo de razões das médias e razões A/P e elaboração de resumo de dados.

## Cálculos

Exemplos:

Média do Controle Negativo ( $CN\bar{x}$ )	$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450-REF) + CN2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0,064 + 0,08}{2} = 0,072$
Média do Controle Positivo ( $CP\bar{x}$ )	$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450-REF) + CP2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0,560 + 0,596}{2} = 0,578$
Relação A/P	$A/P = \frac{\text{Amostra } A(450-REF) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$	<p>Amostra = A(450-REF) = 0,750</p> $A/P = \frac{0,750 - 0,072}{0,578 - 0,072} = 1,34$

## Interpretação de Resultados

A presença ou não de anticorpos contra o vírus da SRRS é determinada calculando-se a relação amostra:positivo de cada amostra.

- Se a relação A/P for menor que 0,40, a amostra é classificada como NEGATIVA para anticorpos anti-SRRS.
- Se a relação A/P for igual ou superior a 0,40, a amostra é classificada como POSITIVA para anticorpos anti-SRRS.

## Resumo do procedimento do teste

Recomenda-se enfaticamente ler as instruções completas, cuidadosamente, antes de realizar o teste pela primeira vez.

Etapa	Ação
<b>1. Preparo dos reagentes</b>	O Concentrado de Lavagem deve atingir 18–26°C e ser homogeneizado para dissolver quaisquer sais precipitados. O Concentrado de Lavagem deve ser diluído 10 vezes (1/10) em água destilada ou deionizada antes do uso (p.ex. 30 ml de concentrado em 270 ml de água por placa de teste).
<b>2. Preparo das Amostras</b>	Diluir as amostras a serem testadas 1/2 com o Diluente de Amostra (p. ex. para diluir 100 µl de amostra, utilize 100 µl de diluente).
<b>3. Distribuição das Amostras e Controles</b>	Distribuir 100 µl de Controle Negativo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas, em duplicata. Distribuir 100 µl de Controle Positivo NÃO DILUÍDO nas cavidades apropriadas em duplicata. Distribuir 100 µl da amostra diluída nas cavidades apropriadas, empregando uma ponteira diferente para cada amostra.
<b>4. Incubação das Amostras</b>	Cubra as cavidades e incubar por 2 horas (±5 min.) à 18–26°C.
<b>5. Lavagem da Placa</b>	Esvaciar ou aspirar o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar bem cada cavidade (3 a 5 vezes) com cerca de 300 µl de Solução de Lavagem. Remover o conteúdo líquido de todas as cavidades após cada lavagem. Evitar que as placas sequem entre as lavagens e antes da adição do conjugado. Após a remoção da Solução de Lavagem final, remover o líquido residual batendo cuidadosamente, porém com firmeza a placa sobre material absorvente.
<b>6. Distribuição do Conjugado</b>	Distribuir 100 µl de Conjugado em cada cavidade.
<b>7. Incubação do Conjugado</b>	Incubar por 30 minutos (±2 min.) à 18–26°C.
<b>8. Repita a etapa 5</b>	
<b>9. Distribuição do Substrato</b>	Distribuir 100 µl de Substrato TMB No. 12 em cada cavidade.
<b>10. Incubação do Substrato</b>	Incubar por 15 minutos (±1 min.) à 18–26°C.
<b>11. Interrupção da reação</b>	Distribuir 100 µl de Solução de Interrupção No. 3 em cada cavidade da placa de teste para interromper a reação.
<b>12. Leitura da placa</b>	Medir e registrar o seu (450-REF) para amostras, controles dentro 30 minutos de paragem da reacção. Calcular os resultados.
<b>13. Interpretação</b>	Se a relação A/P for menor que 0,40, a amostra é classificada como NEGATIVA para anticorpos anti-SRRS. Se a relação A/P for igual ou superior a 0,40, a amostra é classificada como POSITIVA para anticorpos anti-SRRS.

## **Références**

1. J. Zimmerman and K.-J. Yoon, Editors, The PRRS Compendium (second ed.), National Pork Board, Des Moines, IA (2003).
2. Kittawornrat A, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 24(2):262-9 (2012).
3. Prickett JR and Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *An Health Res Rev*, 11: 207-216 (2010).
4. Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the PRRSV oral fluid ELISA. *J Swine Health Prod* (in press).

## **Para assistência técnica:**

Contacte o representante local IDEXX ou visite: [www.idexx.com/production/contact](http://www.idexx.com/production/contact)

IDEXX Technical Support: 00 800 727 43399

\*IDEXX e Test With Confidence são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories Inc. ou de suas filiais nos Estados Unidos e/ou em outros países.

© 2013 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

## Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino en Fluidos Orales

Para uso veterinario exclusivo.

### Nombre y uso propuesto

IDEXX PRRS OF es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de anticuerpos frente al virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV) en muestras de individuales de fluidos orales o en mezclas de muestras de fluidos orales obtenidas de un corral de porcino\*.

### Información general

El virus del Síndrome Respiratorio y reproductor porcino (PRRSV) es un arterivirus que fue identificado tanto en Europa como en Estados Unidos a finales de los 80 como cepas diferentes de antigenicidad variable<sup>1</sup>. El virus causa problemas reproductivos (abortos, lechones débiles, esterilidad y muerte en cerdas), enfermedad respiratoria (pneumonía, dificultad respiratoria, bajo rendimiento y muerte) así como signos neurológicos moderados. El PRRS se considera como una de las enfermedades con mayor impacto económico que afecta a la industria porcina. La evaluación de la exposición en la explotación al virus tras una infección natural o tras una vacunación es posible gracias a la ayuda de la medición de tasa de anticuerpos en el suero o plasma. Recientemente, la detección de anticuerpos en muestras de fluidos orales está usándose cada vez más como herramienta para monitorizar la exposición a PRRS en porcino<sup>2,3</sup>. Es importante que el diagnóstico empleado para la medición de la tasa de anticuerpos sea capaz de detectar las diferentes cepas existentes del virus. Para uso veterinario exclusivo.

### Descripción y principios

IDEXX PRRS OF es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de anticuerpos frente al virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV) en muestras de fluidos orales de porcino. Se ha configurado un formato de microtitulación mediante el tapizado con antígenos IgG PRRSV en la placa. Cuando se incuba la muestra en el pocillo tapizado, los anticuerpos IgG específicos frente al PRRSV forman un complejo con los antígenos virales del tapizado. Después de lavar y eliminar el material no fijado en los pocillos, se añade un conjugado anti-porcino-IgG peroxidasa que se une a los anticuerpos porcinos fijados en los pocillos. Durante la última etapa de la prueba, se elimina el conjugado no fijado, y se añade a los pocillos un sustrato TMB, desarrollándose una coloración azul, que vira a amarilla tras añadir una solución de frenado ácida. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos frente al PRRSV presentes en la muestra.

\*El rendimiento descrito para muestras provenientes de grupos de cerdos estabulados en corrales está basado en un estudio realizado con 500 cerdos divididos en grupos de 25 cerdos por corral. Cerdos vacunados con vacuna viva modificada (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc.) 14 días antes de iniciarse el estudio (pico de la seroconversión de anticuerpos) fueron introducidos en corrales de cerdos seronegativos en anticuerpos frente a PRRS para reproducir diferentes niveles de prevalencia de cerdos positivos en anticuerpos (0%, 4%, 12%, 20%, 36%) con 5 corrales por cada nivel de prevalencia. Se tomaron muestras de suero de cada cerdo para confirmar los títulos de anticuerpos. Se recogieron muestras de fluidos orales de cada corral mediante el uso de una cuerda de algodón expuesta en el corral durante 30 minutos. Se realizaron cinco muestras sucesivas de 30 minutos cada una por corral, colgando una nueva cuerda, por corral, para cada evento de colección de muestras. Se detectaron anticuerpos frente a PRRS en un mínimo del 96% de todas las colectas cuando la prevalencia era de al menos 20% de cerdos (vacunados) seropositivos.

Reactivos		Volumen
1	Placa tapizada con Antígeno PRRSV	5
2	Control Positivo	1 x 4 ml
3	Control Negativo	1 x 4 ml
4	Conjugado	1 x 60 ml
5	Diluyente de la Muestra	1 x 120 ml
A	Sustrato TMB No.12	1 x 60 ml
B	Solución de Frenado No.3	1 x 60 ml
C	Solución de Lavado Concentrada (10X)	1 x 235 ml
<b>Otros componentes:</b> Bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable		1

**Nota:** Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos internacionales utilizados en las etiquetas del kit.

### Materiales necesarios que no se suministran

- Pipetas de precisión monocanal o multicanal apropiadas para distribuir de 5 a 1000  $\mu$ l (los volúmenes de los reactivos descritos en el apartado “Protocolo del ensayo” requieren una pipeta con una precisión inferior o igual al 5%).
- Cubiertas de placas (tapa, papel de aluminio o adhesivo, etc)
- Puntas de pipeta desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de microplacas de 96 pocillos provisto de filtro de longitud de onda doble de 450nm y 650nm
- Agua destilada o desionizada
- Dispositivo para la aplicación y aspiración de Solución de Lavado
- Trampa de retención de aspirado y desinfectante
- Tubos para dilución de muestras

### Precauciones y advertencias para los usuarios

- Se obtendrán resultados óptimos si sigue escrupulosamente este protocolo. Para mantener la precisión y reproducibilidad es necesario un pipeteo correcto, respetar los tiempos de incubación y un lavado adecuado.
- No exponer la solución TMB a una luz intensa ni a agentes oxidantes. Manejar dicha solución con material limpio de plástico o vidrio.
- Almacenar todos los reactivos a 2–8°C. Dejar que adquieran 18–26°C antes de utilizarlos, y refrigerarlos de nuevo a 2–8°C después de su uso.
- Manipular con cuidado los componentes del kit para evitar contaminaciones.
- No utilice los kits pasada su fecha de caducidad y no mezcle componentes de kits con número de serie distintos.
- Utilizar sólo agua desionizada o destilada para la preparación de los reactivos que se empleen en el ensayo.
- Los pocillos que no se usen deberán almacenarse bien cerrados dentro de su bolsa de plástico a 2–8°C.
- Los dos controles deben usarse para cada serie de ensayos.

## Recolección y manejo de muestras

Las muestras de fluidos orales pueden ser colectadas individualmente o en grupos de cerdos en corrales utilizando una cuerda suspendida siguiendo la metodología disponible en internet o en la literatura<sup>2,3</sup>.

## Advertencia

Cuando se analizan muestras de fluidos orales de cerdos con dietas de transición durante las primeras edades post-destete, hay que tener en cuenta al interpretar resultados, que los fluidos orales de cerdos alimentados con dietas con suplementos pulverizados de plasma de origen porcino pueden producir resultados positivos debido a la presencia de anticuerpos de PRRSV en el suplemento de plasma porcino<sup>4</sup>.

## Prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No coma, beba o fume en las zonas donde se manejen los especímenes o reactivos de kits.
- Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de ser eliminados. Deseche el contenido de conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- La solución de sustrato irrita los ojos, el aparato respiratorio y la piel. Evite el contacto con la piel y los ojos.

## Preparación de los reactivos

### Solución de Lavado

Determinar la cantidad de Solución de Lavado necesaria para lavar las placas. Diluir la Solución de Lavado Concentrada (10X) a una dilución 1:10 con agua destilada o desionizada (1 parte de Solución de Lavado Concentrada (10X) con 9 partes de agua, por ejemplo 30 ml de Solución de Lavado Concentrada (10X) + 270 ml de agua destilada). Si se prepara en condiciones estériles (agua y recipientes estériles) esta solución puede usarse durante 9 días si se almacena a 2–8°C.

## Preparación de las muestras

Diluir las muestras 1:2 con el Diluyente de la Muestra (por ejemplo disolviendo 100  $\mu$ l de muestra con 100  $\mu$ l de Diluyente de la Muestra). **Nota:** No diluir los controles. Asegurarse de cambiar de punta de pipeta para cada muestra, y registrar la posición de cada muestra en la placa mediante una hoja de trabajo. Las muestras deben mezclarse antes de dispensarlas en la placa tapizada con PRRSV.

## Protocolo del ensayo

Todos los reactivos se deben equilibrar a 18–26°C antes de su empleo. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos en un vórtex suavemente. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra.

1. Tomar las placas tapizadas con antígeno y registrar la posición de la muestra en una hoja de trabajo.
2. Dispensar 100  $\mu$ l de Control Negativo SIN DILUIR en dos pocillos de la placa.
3. Dispensar 100  $\mu$ l de Control Positivo SIN DILUIR en dos pocillos de la placa.
4. Dispensar 100  $\mu$ l de muestra DILUIDA en los pocillos correspondientes.
5. Cubrir la placa e incubar durante 2 horas ( $\pm$ 5 min.) a 18–26°C.
6. Vaciar o aspirar el contenido de los pocillos y lavar bien cada pocillo con aproximadamente 300  $\mu$ l de Solución de Lavado, entre tres y cinco veces. Eliminar el contenido de todos los pocillos después de cada lavado. No permitir que las placas se sequen entre uno y otro lavado, o antes de añadir el Conjugado. Después de la eliminación final del fluido, golpear ligeramente pero con firmeza cada placa para eliminar el fluido de lavado residual en algún material absorbente dispuesto para tal efecto.

7. Añadir 100  $\mu$ l de Conjugado en cada pocillo.
8. Incubar durante 30 minutos ( $\pm 2$  min.) a 18–26°C.
9. Repetir el paso 6.
10. Añadir 100  $\mu$ l de Substrato TMB No. 12 a cada pocillo de la placa.
11. Incubar durante 15 minutos ( $\pm 1$  min.) a 18–26°C.
12. Añadir 100  $\mu$ l de Solución de Frenado No.3 a cada pocillo de la placa para frenar la reacción.  
Añadir la Solución de Frenado No.3 en el mismo orden en que se añadió el Substrato TMB No.12 en el paso 10.
13. Medir y anotar la absorbancia A (450 nm–REF) para las muestras y controles en los 30 minutos siguientes a haber añadido la Solución de Frenado No.3. REF significa longitud de onda de referencia, que está comprendida en el rango A(620) a A (650nm).
14. Calcular los resultados.

## Resultados

Para que el ensayo sea válido, la media del Control Positivo menos la media del Control Negativo ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) debe de ser mayor o igual a 0,150. Además, la media del Control Negativo ( $CN\bar{x}$ ) debe ser menor o igual que 0,150. Si la prueba es inválida, se sospechará de la técnica empleada, y deberá repetirse después de un examen detallado de las instrucciones que acompañan a este producto. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al PRRSV se determina calculando el coeficiente muestra sobre positivo (M/P). Ver los ejemplos en la sección “Cálculos”.

**Nota:** IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y relaciones M/P, y la elaboración de resúmenes de datos.

## Cálculos

Ejemplos:

Media del Control Negativo ( $CN\bar{x}$ )	$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450-REF) + CN2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0,064 + 0,08}{2} = 0,072$
Media del Control Positivo ( $CP\bar{x}$ )	$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450-REF) + CP2 A(450-REF)}{2}$	$\frac{0,560 + 0,596}{2} = 0,578$
Cociente M/P	$M/P = \frac{\text{Muestra } A(450-REF) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$	$\text{Muestra} = A(450-REF) = 0,750$ $M/P = \frac{0,750 - 0,072}{0,578 - 0,072} = 1,34$

## Interpretación de los resultados

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al PRRSV se determina calculando el coeficiente M/P de cada muestra.

- Si el coeficiente M/P es inferior a 0,40, la muestra se clasifica como NEGATIVA en anticuerpos frente al PRRSV.
- Si el coeficiente M/P es superior o igual a 0,40, la muestra se clasifica como POSITIVA en anticuerpos frente al PRRSV.



## Resumen del protocolo del test

Se recomienda antes de la realización del test por primera vez, realizar una lectura completa del manual de instrucciones.

Paso	Acción
<b>1. Preparación de los reactivos</b>	La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe llevarse a 18–26°C y agitarse con el fin de obtener la disolución de cualquier sal precipitada. La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe disolverse con agua destilada/desionizada antes de usarlo (por ejemplo, 30 ml de La Solución de Lavado Concentrada (10X) en 270 ml de agua por placa analizada).
<b>2. Preparación de las muestras y controles</b>	Diluir las muestras 1:2 con el Diluyente de la Muestra (por ejemplo disolviendo 100 µl de muestra con 100 µl de Diluyente de la Muestra). <b>Nota:</b> No diluir los controles.
<b>3. Distribución de las muestras</b>	Dispensar 100 µl de Control Negativo SIN DILUIR en dos pocillos de la placa. Dispensar 100 µl de Control Positivo SIN DILUIR en dos pocillos de la placa. Dispensar 100 µl de muestra DILUIDA en los pocillos correspondientes.
<b>4. Incubación de la muestra</b>	Cubrir la placa e incubar durante 2 horas (±5 min.) a 18–26°C.
<b>5. Lavado de la placa</b>	Vaciar o aspirar el contenido líquido de todos los pocillos. Vaciar o aspirar el contenido de los pocillos y lavar bien cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado entre tres y cinco veces. Eliminar el contenido de todos los pocillos después de cada lavado. No permitir que las placas se sequen entre uno y otro lavado, o antes de añadir el Conjugado. Después de la eliminación final del fluido, golpear ligeramente pero con firmeza cada placa para eliminar el fluido de lavado residual en algún material absorbente dispuesto para tal efecto.
<b>6. Distribución del conjugado</b>	Añadir 100 µl de Conjugado en cada pocillo.
<b>7. Incubación del conjugado</b>	Incubar durante 30 minutos (±2 min.) a 18–26°C.
<b>8. Repetir el paso 5</b>	
<b>9. Distribución del sustrato</b>	Añadir 100 µl de Sustrato TMB No.12 a cada pocillo de la placa.
<b>10. Incubación del sustrato</b>	Incubar durante 15 minutos (±1 min.) a 18–26°C.
<b>11. Frenado de la reacción</b>	Añadir 100 µl de Solución de Frenado No.3 a cada pocillo de la placa para frenar la reacción.
<b>12. Lectura de la placa</b>	Medir y registrar la A(450-REF) de las muestras y de los controles dentro de los 30 minutos siguientes a haber añadido la Solución de Frenado No.3. Calcular los resultados.
<b>13. Interpretación</b>	Si el coeficiente M/P es inferior a 0,40, la muestra se clasifica como NEGATIVA en anticuerpos frente al PRRSV. Si el coeficiente M/P es superior o igual a 0,40, la muestra se clasifica como POSITIVA en anticuerpos frente al PRRSV.

## Referencias

1. J. Zimmerman and K.-J. Yoon, Editors, The PRRS Compendium (second ed.), National Pork Board, Des Moines, IA (2003).
2. Kittawornrat A, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 24(2):262-9 (2012).
3. Prickett JR and Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *An Health Res Rev*, 11: 207-216 (2010).
4. Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the PRRSV oral fluid ELISA. *J Swine Health Prod* (in press).

## Para asistencia técnica:

contacte el representante local IDEXX o visite: [www.idexx.com/production/contact](http://www.idexx.com/production/contact)  
IDEXX US Technical Support: 00 800 727 43399

**N.º de registro: 2758-RD**

\*IDEXX y Test With Confidence son marcas o marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. o sus filiales en los Estados Unidos de America y/o en otros países.

©2013 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

## Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das PRRS Virus (Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom) in Speichelproben von Schweinen

Gebrauchsinformation. In vitro-Diagnostikum. Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

### Name und Verwendungszweck

IDEXX PRRS OF ist ein Markenzeichen von IDEXX für einen Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen das PRRS-Virus (Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom) in Einzel-Speichelproben von Schweinen oder Pool-Speichelproben aus einer Bucht\*.

### Allgemeine Informationen

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) ist ein Arterivirus, von dem erstmals sowohl in Europa als auch in den USA in den späten 80-er Jahren berichtet wurde<sup>1</sup>. Es gibt verschiedene PRRSV-Stämme mit variabler Antigenität. Das Virus verursacht Reproduktionsstörungen (Fehlgeburten, lebensschwache Ferkel, verminderte Wurfzahlen, Todesfälle bei den Sauen), respiratorische Erkrankungen (Lungenentzündung, Schwierigkeiten beim Atmen und dadurch verursachte Schwäche und Tod) sowie schwache neurologische Symptome. PRRS ist eine der Krankheiten, welche die Schweineindustrie wirtschaftlich am stärksten beeinträchtigt. Die Bestimmung des Antikörperspiegels im Serum oder Plasma hilft die Frage zu beantworten, ob ein Tier dem PRRS-Virus im Rahmen einer Impfung oder natürlichen Infektion ausgesetzt war. Der Nachweis von Antikörpern aus Speichelproben von Schweinen wird seit kurzem vermehrt zur Überwachung von Schweinen, welche mit PRRS in Kontakt gekommen sind eingesetzt<sup>2,3</sup>. Es ist wichtig, dass der zur Immundiagnose verwendete Test verschiedene Stämme nachweisen kann.

### Beschreibung des Testprinzips

IDEXX PRRS OF ist ein Markenzeichen von IDEXX für einen Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen das PRRS-Virus (Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom) in Speichelproben von Schweinen. Es wurde ein Mikrotitrationssystem entwickelt, bei dem die Vertiefungen einer Testplatte mit rekombinantem PRRS-Virusantigen beschichtet werden. Während der Inkubation der Proben in den Vertiefungen der Platte bilden die PRRSV-spezifischen Antikörper einen Komplex mit dem beschichteten Virusantigen. Ungebundenes Material wird aus den Vertiefungen gewaschen. Dann wird ein Anti-Schwein-IgG : Meerrettichperoxidase (= HRPO)-Konjugat hinzugefügt, das sich an alle in der Beschichtung der Vertiefung haftenden Antikörper bindet. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt und TMB Substrat wird in die Vertiefungen gegeben. Durch Zugabe einer Stopplösung wird die Reaktion beendet und es kommt zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbintensität ist proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern gegen PRRS in der Probe.

\*Die Verwendung von Gruppenproben basiert auf einer Studie mit 500 Tieren, welche in Gruppen von je 25 Schweinen aufgeteilt waren. Schweine, welche 14 Tage vor Studienbeginn (beim Höhepunkt der Serokonversion für die Antikörper) mit einer modifizierten Lebendvaccine (Ingelvac® PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc.) geimpft wurden, wurden in Gruppen von PRRS Antikörper seronegativen Schweinen untergebracht, und zwar Schweine unterschiedlicher Prävalenz hinsichtlich positiver Antikörper (0%, 4%, 12%, 20% und 36%), für jede Prävalenzstufe 5 Gruppen. Blutproben wurden von allen Schweinen zur Bestätigung von Serum-Antikörper-Titern entnommen. Speichelproben wurden von einem Baumwollstrick gewonnen, welcher 30 Minuten in jeder Bucht hing. Es wurden fünf weitere 30-minütige Probensammlungen vorgenommen, indem jeweils ein neuer Strick in den Buchten angebracht wurde. PRRS Antikörper wurden in mindestens 96% aller Probensammlungen bei einer Prävalenz von mindestens 20% seropositiven (geimpften) Schweinen nachgewiesen.

Reagenzien		Menge
1	Mit PRRSV-Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert)	5
2	Positive Kontrolle	1 x 4 ml
3	Negative Kontrolle	1 x 4 ml
4	Konjugat	1 x 60 ml
5	Probenverdünner	1 x 120 ml
A	TMB-Substrat Nr.12	1 x 60 ml
B	Stopplösung Nr.3	1 x 60ml
C	Waschkonzentrat (10X)	1 x 235 ml
<b>Sonstige Komponenten:</b> Wiederverwendbarer Druckverschlussbeutel		1

**Hinweis:** Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die auf den Etiketten verwendeten internationalen Symbole erläutert.

### Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Präzisionspipetten: 5  $\mu$ l bis 1000  $\mu$ l (die erforderliche Messgenauigkeit muss für sämtliche angegebenen Mengen kleiner oder gleich 5% sein).
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie)
- Einweg-Pipettenspitzen
- Graduierter Zylinder für die Waschlösung
- Photometer mit dualem Filter für 450 nm und 650 nm
- Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
- Gerät zur Abgabe und Aufnahme von Waschlösung
- Ein Behälter zur Aufnahme des abgesaugten Materials
- Röhrchen für die Probenverdünnung

### Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Optimale Ergebnisse werden nur bei strenger Einhaltung der Testanweisung erzielt. Präzision und Genauigkeit werden durch sorgfältiges Pipettieren und Waschen erreicht.
- Die TMB-Lösung keiner starken Lichteinstrahlung oder oxidierenden Substanzen aussetzen. Beim Umgang mit TMB-Lösung sauberes Glas oder Kunststoff verwenden.
- Alle Reagenzien bei 2–8°C lagern. Die Reagenzien müssen vor Verwendung auf 18–26°C gebracht und nach Gebrauch wieder bei 2–8°C gekühlt gelagert werden.
- Eine Kontamination der Kitbestandteile mit Bakterien oder Pilzen muss sorgfältig vermieden werden. Daher bei der Handhabung der Reagenzien mit größter Sauberkeit vorgehen.
- Die Testbestandteile nicht nach Ablauf des Verfalldatums verwenden und Testbestandteile und Testanweisungen nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischen.
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden.
- Nicht verwendete Teststreifen bei 2–8°C im verschlossenen Plastikbeutel lagern.
- Bei jeder Testserie die beiden Kontrollseren mitführen.

## Probensammlung und Vorbereitung

Speichelproben können von Einzeltieren oder kollektiv von Schweinegruppen gesammelt werden, indem Stricke in Schweinebuchten aufgehängt werden. Die Methode dazu ist vielfach in der Literatur publiziert<sup>2,3</sup>.

### Zur Beachtung

Die Interpretation von Ergebnissen bei der Untersuchung der Speichelproben von Schweinen, welche eine Übergangsdät in den ersten Wochen nach dem Absetzen erhalten, ist mit Vorsicht zu betrachten. Speichelproben von Schweinen, die mit einer Zusatznahrung von sprühgetrocknetem Schweineplasma gefüttert werden, können aufgrund des Vorliegens von PRRS Antikörpern in der Schweineplasma-Zusatznahrung<sup>4</sup> positive Ergebnisse anzeigen.

### Laborpraktiken

- Nicht per Mund pipettieren.
- Nicht in dem Bereich essen, trinken oder rauchen, wo Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden.
- Alle Abfälle vor der Entsorgung ordnungsgemäß dekontaminieren. Den Inhalt im Einklang mit den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Die Substratlösung reizt Augen, Atemwege und Haut. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.

### Vorbereitung der Reagenzien

#### Waschlösung

Herstellung der Waschlösung aus dem Waschkonzentrat (10X): 1 Teil Waschkonzentrat (10X) mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen. Bei steriler Zubereitung kann die Waschlösung eine Woche bei 2–8°C aufbewahrt werden.

#### Vorbereitung der Proben

Die Proben 1:2 mit dem Probenverdünner verdünnen (z.B. 100 µl der Probe mit 100 µl Probenverdünner).

**Achtung:** Nicht die Kontrollen verdünnen! Die Pipettenspitze muss nach jeder Probe gewechselt werden. Die Position jeder Probe auf der Platte in das Arbeitsblatt eintragen. Die Proben mischen, bevor sie in die mit PRRS-Virusantigen beschichteten Vertiefungen pipettiert werden.

### Testanweisung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen. Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.

1. Die mit Antigen beschichtete(n) Platte(n) nehmen und die Position der Probe auf einem Arbeitsblatt notieren.
2. 100 µl UNVERDÜNNTEN negative Kontrolle in zwei Vertiefungen geben.
3. 100 µl UNVERDÜNNTEN positive Kontrolle in zwei Vertiefungen geben.
4. 100 µl der VERDÜNNTEN Proben in die danebenliegenden Vertiefungen geben.
5. Vertiefungen abdecken und 2 Stunden (±5 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
6. Die Flüssigkeit aus allen Vertiefungen entfernen und sodann jede Vertiefung drei- bis fünfmal mit etwa 300 µl der Waschlösung waschen. Den flüssigen Inhalt aller Vertiefungen nach jedem Waschen entfernen. Ein Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschkvorgängen und vor Zugabe des Konjugats vermeiden. Nach dem letzten Absaugen der Waschlösung vorsichtig, aber fest die Reste der Waschlösung in den Vertiefungen auf ein Stück Saugpapier klopfen.
7. 100 µl Konjugat in jede Vertiefung geben.
8. 30 Minuten (± 2 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

9. Schritt 6 wiederholen.
10. 100 µl TMB-Substrat Nr.12 in jede Vertiefung der Testplatte geben.
11. 15 Minuten (± 1 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
12. 100 µl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung der Testplatte geben, um die Reaktion zu stoppen. Die Stopplösung Nr.3 in der selben Reihenfolge verteilen wie das TMB-Substrat in Punkt 10 zugegeben wurde.
13. Messen und Notieren von A(450 nm-REF) für Proben und Kontrollen innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung Nr.3. REF ist die Referenzwellenlänge, welche zwischen A(620 nm) und A(650 nm) liegen kann.
14. Ergebnisse berechnen.

## Ergebnisse

Folgende Bedingungen müssen zutreffen, damit der Test gültig ist: Der Mittelwert der positiven Kontrolle minus dem Mittelwert der negativen Kontrolle (PK $\bar{x}$ - NK $\bar{x}$ ) muss größer oder gleich 0,150 sein. Zusätzlich muss der Mittelwert der negativen Kontrolle kleiner oder gleich 0,150 sein. Ungültige Ergebnisse sind möglicherweise auf eine ungenaue Arbeitsweise zurückzuführen; ein solcher Test sollte nach erneutem Studium der Gebrauchsinformation wiederholt werden. Das Vorhandensein oder Fehlen von PRRS-Virusantikörpern wird festgestellt, indem man für jede Probe das P/PK-Verhältnis ("Probe/Positive Kontrolle" Verhältnis) ermittelt. Beispiele dem Abschnitt "Berechnungen" entnehmen.

**Hinweis:** IDEXX bietet auch Instrumente und Software zur Berechnung der Mittel- und korrigierten OD-Werte sowie zur Datenverarbeitung an.

## Berechnungen

Beispiele:

Mittelwert der negativen Kontrollen (NK $\bar{x}$ )	$NK\bar{x} = \frac{NK1 \text{ A}(450\text{-REF}) + NK2 \text{ A}(450\text{-REF})}{2}$	$\frac{0,064 + 0,08}{2} = 0,072$
Mittelwert der positiven Kontrollen (PK $\bar{x}$ )	$PK\bar{x} = \frac{PK1 \text{ A}(450\text{-REF}) + PK2 \text{ A}(450\text{-REF})}{2}$	$\frac{0,560 + 0,596}{2} = 0,578$
P/PK-Verhältnis	$P/PK = \frac{\text{Probe A}(450\text{-REF}) - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}}$	Beispiel: Probe=A(450-REF)=0,750 $P/PK = \frac{0,750 - 0,072}{0,578 - 0,072} = 1,34$

## Interpretation der Ergebnisse

Das Vorhandensein oder Fehlen von PRRS-Antikörpern wird festgestellt, indem man für jede Probe das P/PK-Verhältnis (Verhältnis Probe/Positive Kontrolle) ermittelt.

- Proben mit einem P/PK-Verhältnis unter 0,40 werden als NEGATIV für Antikörper gegen das PRRS-Virus betrachtet.
- Wenn das P/PK-Verhältnis größer oder gleich 0,40 ist, so wird die Probe als POSITIV für Antikörper gegen das PRRS-Virus betrachtet.

## Kurzbeschreibung

Es ist empfehlenswert vor dem ersten Gebrauch des Testkits die gesamte Anleitung durchzulesen.

Schritt	Handlung
<b>1. Vorbereitung der Reagenzien</b>	Herstellung der Waschlösung aus dem Waschkonzentrat (10X): 1 Teil Waschkonzentrat (10X) mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen. Bei steriler Zubereitung kann die Waschlösung eine Woche bei 2-8°C aufbewahrt werden.
<b>2. Vorbereitung des Proben</b>	Die Proben 1:2 mit dem Probenverdünner verdünnen (z.B. 100 µl der Probe mit 100 µl Probenverdünner). <b>ACHTUNG:</b> Nicht die Kontrollen verdünnen!
<b>3. Verteilung der Proben und Kontrollen</b>	100 µl UNVERDÜNNT negative Kontrolle in zwei Vertiefungen geben. 100 µl UNVERDÜNNT positive Kontrolle in zwei Vertiefungen geben. 100 µl der VERDÜNNTEN Proben in die danebenliegenden Vertiefungen geben.
<b>4. Probeninkubation</b>	Testplatte abgedeckt 2 Stunden (± 5 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
<b>5. Waschen der Platte</b>	Die Flüssigkeit aus allen Vertiefungen entfernen und sodann jede Vertiefung drei- bis fünfmal mit etwa 300 µl der Waschlösung waschen. Den flüssigen Inhalt aller Vertiefungen nach jedem Waschen entfernen. Ein Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschvorgängen und vor Zugabe des Konjugats vermeiden. Nach dem letzten Absaugen der Waschlösung vorsichtig, aber fest die Reste der Waschlösung in den Vertiefungen auf ein Stück Saugpapier klopfen.
<b>6. Konjugatverteilung</b>	100 µl Konjugat in jede Vertiefung geben.
<b>7. Konjugatinkubation</b>	30 Minuten (± 2 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
<b>8. Schritt 5 wiederholen</b>	
<b>9. Verteilen des Substrats</b>	100 µl TMB-Substrat Nr.12 in jede Vertiefung der Testplatte geben.
<b>10. Substratinkubation</b>	15 Minuten (± 1 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
<b>11. Stoppen der Reaktion</b>	100 µl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung der Testplatte geben.
<b>12. Messen der Platte</b>	Messen und Notieren der A 450-REF Werte für Proben und Kontrollen bis zu 30 Min. nach dem Stoppen der Reaktion. Ergebnisse berechnen.
<b>13. Interpretation</b>	Proben mit einem P/PK-Verhältnis unter 0,40 werden als NEGATIV für Antikörper gegen das PRRS-Virus betrachtet. Wenn das P/PK-Verhältnis größer oder gleich 0,40 ist, so wird die Probe als POSITIV für Antikörper gegen das PRRS-Virus betrachtet.

## Referencias

1. J. Zimmerman and K.-J. Yoon, Editors, The PRRS Compendium (second ed.), National Pork Board, Des Moines, IA (2003).
2. Kittawornrat A, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 24(2):262-9 (2012).
3. Prickett JR and Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *An Health Res Rev*, 11: 207-216 (2010).
4. Johnson JK, Main R, Zimmerman J. 2012. Exogenous sources of PRRSV antibody detectable in the PRRSV oral fluid ELISA. *J Swine Health Prod* (in press).

## Für technische Unterstützung:

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite:

[www.idexx.com/production/contact](http://www.idexx.com/production/contact)

IDEXX Technical Support: 00 800 727 43399





**Zul.-Nr.: FLI-B 633**

\*IDEXX und Test With Confidence sind Schutzmarken oder eingetragene Schutzmarken von IDEXX Laboratories, Inc. oder eines Tochterunternehmens von IDEXX in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern.

© 2013 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.



**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Symbol-Beschreibungen /  
Descrizione dei simboli / Descripciones de los símbolos / Descrições do símbolos**

<p><b>Batch Code (Lot)</b>          Numéro de lot          Chargenbezeichnung (Ch.-B.)          Codice del lotto (partita)          Código de lote (Lote)          Número de Partida (Lote)</p> <p></p>	<p><b>Use by date</b>          À utiliser avant la date          Verwendbar bis          Usare entro          Usar antes de          Data de Vencimento</p> <p></p>
<p><b>Serial Number</b>          Numéro de série          Seriennummer          Numero di serie          Número de serie          Número de série</p> <p></p>	<p><b>Control positive</b>          Contrôle positif          Positive Kontrolle          Controllo Positivo          Control Positivo          Controle Positivo</p> <p></p>
<p><b>Catalog Number</b>          Numéro de catalogue          Katalognummer          Numero di catalogo          Número de catálogo          Número de catálogo</p> <p></p>	<p><b>Control negative</b>          Contrôle négatif          Negative Kontrolle          Controllo Negativo          Control Negativo          Controle Negativo</p> <p></p>
<p><b>Date of manufacture</b>          Date de fabrication          Herstellungsdatum          Data di produzione          Fecha de fabricación          Data de Fabricação</p> <p></p>	<p><b>In vitro diagnostic</b>          Diagnostic in vitro          In vitro-Diagnostikum          Diagnostico in vitro          Diagnóstico in-vitro          Diagnóstico in-vitro</p> <p></p>
<p><b>Manufacturer</b>          Fabricant          Hersteller          Ditta produttrice          Fabricante          Fabricante</p> <p></p>	<p><b>Temperature limitation</b>          Limite de température          Zulässiger Temperaturbereich          Limite di temperatura          Límite de temperatura          Limite de temperatura</p> <p></p>
<p><b>Authorized Representative in the European Community</b>          Représentant agréé pour la Communauté européenne          Autorisierte EG-Vertretung          Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea          Representante autorizado na Comunidade Européia          Representante autorizado en la Comunidad Europea</p> <p></p>	<p><b>Consult instructions for use</b>          Consulter la notice d'utilisation          Gebrauchsinformation beachten          Consultare le istruzioni per l'uso          Consultar las instrucciones de uso          Consulte instruções para o uso</p> <p></p>





**IDEXX**

*Manufacturer*

IDEXX Switzerland AG  
Stationsstrasse 12  
3097 Liebefeld-Bern, Switzerland

*EU-Representative*

IDEXX Europe B.V.  
P.O. Box 1334  
2130 EK Hoofddorp  
The Netherlands

[idexx.com](http://idexx.com)