

## SERELISA® BHV-1 Total Ab Mono Indirect

**KIT PARA LA DETECCIÓN DE LOS ANTICUERPOS  
CONTRA EL VIRUS DE LA RHINOTRAQUEITIS  
INFECCIOSA BOVINA / VULVOVAGINITE PUSTULOSA  
EN SUEROS, PLASMAS  
(INDIVIDUALES Y MEZCLAS DE 10)  
Y LECHE DE BOVINOS  
(INDIVIDUALES Y MEZCLAS HASTA 200 LECHE)**

### TÉCNICA INMUNO-ENZIMÁTICA DE BLOQUEO

384 reacciones de pocillo simple

#### I. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit SERELISA® BHV-1 Total Ab Mono Indirect se basa en una técnica inmuno-enzimática de bloqueo que permite la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus del herpes bovino de tipo 1 (BHV1) en sueros y plasmas (individuales y mezclas incluyendo hasta 10 muestras) y leches de bovinos (individuales y mezclas hasta 200 leches). Consiste en tres pasos:

- Cada muestra se distribuye en un pocillo sensibilizado con un antígeno viral. Los anticuerpos presentes en la muestra se fijan de modo específico al antígeno viral.
- Después de varios pasos de lavado, se añade un conjugado monoclonal (AcM) anti-IgG de bovino /peroxidasa. Este se fija en los anticuerpos presentes, formando un complejo:  
(Ag) - (Ac) - (AcM anti-IgG de bovino /peroxidasa)
- El exceso de conjugado es eliminado a través de varios lavados. La enzima es revelada por la adición de un sustrato que se transforma en un producto coloreado. Las densidades ópticas correspondientes se registran y se interpretan según umbrales calculados a partir del control positivo.

#### II. COMPOSICIÓN Y CONSERVACIÓN DEL KIT

REACTIVOS	RECONSTITUCION Y CONSERVACION
4 microplacas conteniendo 6 tiras de 2 x 8 pocillos sensibilizados con el Ag viral.	Para usar dentro de 2 meses después de la apertura de la bolsa que debe permanecer cerrada después de cada uso.
Solución de lavado (W) (Concentrado 10X)	Diluir 10 veces en agua destilada o desmineralizada. Usar dentro de los 5 días a temperatura de laboratorio después de la dilución.
Diluyente de las muestras rojo (SD)	Listo para usar.
Control Negativo (N). Posible aparición de un precipitado no influyente.	Listo para usar.
Control Positivo (P)	Listo para usar.
Diluyente del conjugado azul (CD)	Listo para usar.
Conjugado (concentrado) Mac anti-IgG de bovino / peroxidasa (CJ)	Diluir 20 veces en CD para el protocolo de incubación corta y 25 veces en CD para el protocolo de incubación larga de las muestras. <u>Usar dentro de 2 horas a temperatura de laboratorio después de la dilución.</u>
Sustrato de peroxidasa tamporado (PS)	Listo para usar.
Solución detención (S)	Listo para usar.
Films adhesivos	12 láminas.

**Nota:** El kit y los reactivos diluidos deben conservarse a  $+5 \pm 3^\circ\text{C}$  y utilizarse como se menciona arriba.

#### III. MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS (NO SUMINISTRADOS)

- Agua destilada o desmineralizada.
- Pipetas ajustables, o fijas, para medir y dispensar entre 0 y 1000  $\mu\text{l}$ . La desviación de medición debe ser  $\leq 10\%$  para volúmenes  $\leq 10 \mu\text{l}$  y  $\leq 5\%$  para todos los otros volúmenes.
- Probetas graduadas (100 ml y 1000 ml).
- Lavador de microplacas automático con preferencia para las placas de microtitración.
- Lector de microplacas, filtros para la lectura bicromática a 450 y 630 nm. También se puede utilizar un lector monocromático equipado con un filtro de 450 nm.
- Incubadora a  $+37 \pm 3^\circ\text{C}$ .

#### IV. PRECAUCIONES DE EMPLEO

La calidad de los resultados depende del respeto de las buenas prácticas de laboratorio y del procedimiento (VI).

- No mezclar reactivos de kits con diferentes números de lotes
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Colocar todos los reactivos a temperatura de laboratorio durante al menos 1 hora antes del uso. Cuidado: solo se conciernen los componentes que serán utilizados en la fase siguiente.
- Manipular todos los reactivos y muestras como material de riesgo biológico.
- Mantener todos los reactivos lejos de la piel y los ojos. Si la exposición ocurre, lavar inmediatamente las áreas afectadas con agua fría.
- Nunca pipetear los reactivos con la boca.
- Evitar la contaminación de la muestra durante la recogida de muestras, almacenamiento o transporte. Las puntas de las pipetas deben cambiarse para cada muestra.
- Evitar la contaminación de la solución de sustrato con iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes. Asegurarse de que todos los contenedores estén limpios. No usar el mismo recipiente o la misma punta de la pipeta para el conjugado y el sustrato.
- Se recomienda eliminar los reactivos y material contaminado según la legislación en vigor. Las fichas de datos de seguridad para los productos están disponibles bajo petición.

#### Frases de riesgo y de seguridad:

- R35: Provoca quemaduras graves.  
R36: Irritando los ojos.  
S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediatamente y abundantemente con agua y acúdase al médico.  
S30: Nunca echar agua en el producto.  
S45: En caso de accidente o malestar, buscar consejo médico inmediatamente.  
S60: Eliminar el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

#### V. MUESTRAS

La prueba se realiza en suero o plasma individual o en mezclas incluyendo hasta 10 muestras, y en leche (individual o mezclas hasta 200 leches). **Las mezclas de sueros o plasmas deben ser completadas preferentemente con un suero negativo o con el diluyente de las muestras (SD).**

Los leches deben ser desnatados antes del uso (o sea por decantación durante 1 noche o por centrifugación a fea velocidad)

Las muestras deben mantenerse como sigue:

Muestras	Refrigeración (+5°C)	Congelación (-20°C)	Temperatura ambiental (+23°C)
Suero, Plasma individual o mezcla de 10	Máx. 7 días	Sí	No
Leche individual o mezclas de 200	Máx. 5 días	Sí	No

## VI. PROCEDIMIENTO

Cumplir estrictamente con el procedimiento indicado a continuación. Usar los controles negativo y positivo en duplicado para cada ensayo, para cada placa.

### A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.
2. Preparar el suero o plasma de muestras que deben ser analizadas. Las diluciones pueden ser realizadas, o sea previamente en tubos de hemólisis o en una microplaca no sensibilizada, o directamente en los pocillos.

#### Preparación de Muestras

- Diluir suero o plasma a 1/20 en el diluyente de la muestra. Colocar 190 µl del diluyente de la muestra (**SD**) en los tubos de hemólisis o en una microplaca no sensibilizada mas 10 µl de muestra por pocillo.
- Diluir mezclas de sueros o plasmas a 1/2 en el diluyente de la muestra. Colocar 100 µl del diluyente de la muestra (**SD**) en los tubos de hemólisis o en una microplaca no sensibilizada mas 100 µl de muestra por pocillo.
- Hacer el test de las muestras de leche (individuales o mezclas incluyendo hasta 200 leches) sin dilución.

### B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

#### I - DISTRIBUCIÓN DE CONTROLES Y DE MUESTRAS

##### 1. Distribución de los controles:

Los controles están listos para usar.

Después de agitar los frascos, añadir:

- 200 µl de control negativo (**N**) a los pocillos A1 y A2
- 200 µl del control positivo (**P**) a los pocillos B1 y B2.

##### 2. Distribución de las muestras:

- Colocar 200 µl de las muestras diluidas por pocillo (cf. VI.A.2.)
- Cubrir los pocillos con un film adhesivo, cortar lo necesario para el número de tiras usadas. No es necesario para el protocolo corto.
- Mezclar agitando suavemente la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas.

**Cuidado:** Las muestras pueden analizarse individualmente o por duplicado. Las tiras siempre tienen que colocarse en el cuadro para que se use el lavador así como el lector.

##### 3. Incubación de la placa:

- Protocolo de incubación corta: 1 hora ± 5 min a +37 ± 3°C., o
- Protocolo de incubación larga: una noche (14-18 horas) a +5 ± 3°C.

#### LAVADO:

Solución de lavado: Diluir la solución concentrada de lavado (**W**) a 1/10 en agua destilada o desmineralizada.

Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar **4** veces.

#### II - ADICIÓN DEL CONJUGADO

##### 1. Preparación del conjugado:

Preparar la solución conjugada diluyendo el conjugado concentrado (**CJ**) en el diluyente del conjugado (**CD**), 2 ml son necesarios para una tira:

- **a 1/20** (protocolo de **incubación corta** de las muestras)  
1020 µl de CJ en 1900 µl de CD
- **a 1/25** (protocolo de **incubación larga** de las muestras)  
80 µl de CJ en 1920 µl de CD

**Usar el conjugado dentro de las dos horas que siguen su preparación.**

##### 2. Distribución del conjugado:

Añadir 100 µl de conjugado diluido en todos los pocillos y cubrir con un nuevo trozo de film adhesivo. El uso de un trozo de film adhesivo no es obligatorio.

##### 3. Incubación del conjugado:

Incubar el conjugado durante 30 ± 2 min a +37 ± 3°C.

#### LAVADO:

Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar **4** veces.

#### III - REVELADO

##### 1. Adición del sustrato:

Añadir 100 µl del sustrato de peroxidasa tamponada (**PS**) por pocillo. No cubrir con un film adhesivo en esta etapa. Mezclar agitando la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas para asegurar una correcta mezcla.

##### 2. Incubación del sustrato:

15 ± 2 min a temperatura de laboratorio (+23 ± 5°C), protegido de la luz.

##### 3. Adición de la solución detención:

Añadir 50 µl de solución detención (**S**) por pocillo. Mezclar agitando suavemente la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas. Asegurarse de que no haya burbujas en los pocillos. Secar cuidadosamente el fondo de las placas.

##### 4. Medición de la densidad óptica:

Medir la densidad óptica (DO) bicromáticamente a 450 y 630 nm o monocromáticamente a 450 nm (en la banda amarilla). La lectura bicromática es muy recomendada. Si se utiliza un lector monocromático, garantizar la limpieza de la parte inferior de los pocillos antes de la lectura.

## VII. VALIDACIÓN DE PRUEBA

Los resultados de cada ensayo son válidos si:

- la densidad óptica del control positivo (**P**) es ≥ 0,6, y
- la densidad óptica del control negativo (**N**) es < 0,4

## VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

### SUERO, PLASMA INDIVIDUAL Y MEZCLAS DE 10

### LECHE INDIVIDUAL, MEZCLA HASTA 200 MUESTRAS

- Para cada muestra, calcular el ratio corregido muestra/control positivo (M/P)
- Realizar un promedio de las DO en el momento de varios depósitos de la misma muestra

El ratio M/P se calcula del siguiente modo:

$$M / P = \frac{DO (Muestra) - \overline{DO} (N)}{\overline{DO} (P) - \overline{DO} (N)}$$

$\overline{DO}$  = promedio de las densidades ópticas

#### RESULTADOS

Toda muestra de **suero o plasma individual** presentando un ratio M/P ≥ 0,65, con el protocolo de incubación corta de las muestras, o un ratio M/P ≥ 0,35, con el protocolo de incubación larga de las muestras, es considerada como **positiva**.

Toda muestra de **suero o plasma individual** presentando un ratio M/P < 0,65, con el protocolo de incubación corta de las muestras, o un ratio M/P < 0,35, con el protocolo de incubación larga de las muestras, es considerada como **negativa**.

Toda **mezcla de 10 muestras de suero o plasma** presentando un ratio M/P  $\geq 1,00$ , con el protocolo de incubación corta de las muestras, o presentando un ratio M/P  $\geq 0,80$ , con el protocolo de incubación larga de las muestras, es considerada como **positiva**.

Toda **mezcla de 10 muestras de suero o plasma** presentando un ratio M/P  $< 1,00$ , con el protocolo de incubación corta de las muestras, o presentando un ratio M/P  $< 0,80$ , con el protocolo de incubación larga de las muestras, es considerada como **negativa**.

Toda muestra de **leche individual o mezcla hasta 200 leches** presentando un ratio M/P  $\geq 0,25$  es considerada como **positiva**.

Toda muestra de **leche individual o mezcla hasta 200 leches** presentando un ratio M/P  $< 0,25$  es considerada como **negativa**.

### SUERO y PLASMA INDIVIDUAL

Con el protocolo de <b>incubación corta</b> de las muestras	-	+
	Valores M/P	

M/P 0,65

Con el protocolo de <b>incubación larga</b> de las muestras	-	+
	Valores M/P	

M/P 0,35

### SUERO y PLASMA en MEZCLA DE 10

Con el protocolo de <b>incubación corta</b> de las muestras	-	+
	Valores M/P	

M/P 1,00

Con el protocolo de <b>incubación larga</b> de las muestras	-	+
	Valores M/P	

M/P 0,80

### LECHE INDIVIDUAL y MEZCLA hasta 200 LECHES

Leche individual y mezcla hasta 200 leches	-	+
	Valores M/P	

M/P 0,25

Si tiene usted alguna pregunta, por favor contáctese con nosotros:  
 SYNBIOLOGICS EUROPA - 2 rue Alexander Fleming  
 69367 Lyon Cedex 07 - Francia  
 Tel: +33 4.72.76.11.11 - Fax: +33 4.72.76.11.10  
[www.synbiotics.com](http://www.synbiotics.com) [techsupport@synbiotics.fr](mailto:techsupport@synbiotics.fr)

SÓLO PARA USO VETERINARIO /  
 PARA USO EXCLUSIVO IN VITRO

Instalación clasificada para la protección medioambiental