

SERELISA® BHV-1 gB Ab Mono Blocking

KIT PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-gB DEL VIRUS DE LA RHINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA / VULVOVAGINITE PUSTULOSA EN SUEROS, PLASMAS (INDIVIDUALES) Y LECHE DE BOVINOS (INDIVIDUALES)

TÉCNICA INMUNO-ENZIMÁTICA DE BLOQUEO

384 reacciones de pocillo simple

I. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit SERELISA® BHV-1 gB Ab Mono Blocking se basa en una técnica inmuno-enzimática de bloqueo que permite la detección de anticuerpos anti-glicoproteína de envoltura gB del herpes bovino de tipo 1 (BHV-1) en sueros y plasmas y leches de bovinos. Consiste en tres pasos:

1. Cada muestra se distribuye en un pocillo sensibilizado con la glicoproteína del BHV-1. Los anticuerpos anti-gB presentes en la muestra se fijan de modo específico al antígeno.

2. Después de un paso de lavado, un conjugado agregando dos anticuerpos monoclonales distintos, (AcMx) anti-gB/peroxidasa se añade. Este se fija en los sitios de gB que se quedaron libres, formando un complejo:



3. El exceso de conjugado es eliminado a través de varios lavados. La enzima agregada al complejo Ag/Ac es revelada por la adición de un sustrato que se transforma en un producto coloreado. Las densidades ópticas correspondientes se registran y se interpretan del siguiente modo:

- En ausencia de anticuerpos en la muestra, se observa una reacción con una intensa coloración debida a la fijación del conjugado a los sitios libres del gB de la fase sólida.

- En presencia de anticuerpos específicos en la muestra, habrá menos de conjugado fijado, y por lo tanto la coloración será menor o ausente.

II. COMPOSICIÓN Y CONSERVACIÓN DEL KIT

REACTIVOS	RECONSTITUCIÓN Y CONSERVACIÓN
4 microplacas conteniendo 6 tiras de 2 x 8 pocillos sensibilizados con el gB del BHV-1.	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. 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 10X) Mac anti-gB / peroxidasa (CJ)	Diluir 100 veces en CD. Usar dentro de 3 horas a temperatura de laboratorio después de la dilución.
Sustrato de peroxidasa tamponado (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.

Referencia: SIBR1BN2.NE versión n°3 – 07/10/2010

Las partes en cursiva son las partes modificadas desde la última versión. Versión n°2 → n°3: Retirada de la indicación mezcla.

III. MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS (NO SUMINISTRADOS)

- Agua destilada o desmineralizada.
- Pipetas ajustables, o fijas, para medir y dispensar entre 0 y 1000 µl. 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 manual, automático o semi-automático.
- 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).

1. No mezclar reactivos de kits con diferentes números de lotes
2. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
3. Colocar todos los reactivos a temperatura de laboratorio durante al menos 1 hora antes de utilizar. **Cuidado:** solo se conciernen los componentes que serán utilizados en la fase siguiente.
4. Manipular todos los reactivos y muestras como material de riesgo biológico.
5. Mantener todos los reactivos lejos de la piel y los ojos. Si la exposición ocurre, lavar inmediatamente las áreas afectadas con agua fría.
6. Nunca pipetear los reactivos con la boca.
7. Evitar la contaminación de la muestra durante la recogida de muestras, almacenamiento o transporte. Las puntas de las pipetas deben cambiarse para cada muestra.
8. 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.
9. 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 y en leche individual preferentemente desnatada.

Las muestras deben mantenerse como sigue:

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

VI. PROCEDIMIENTO

Cumplir estrictamente con el procedimiento indicado a continuación. Usar controles negativo y positivo por 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 las muestras (suero, plasma o leche) 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.

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 100 µl de control negativo (N) a los pocillos A1 y A2, y 100 µl de control positivo (P) a los pocillos B1 y B2.

2. Distribución de las muestras:

En el caso de sueros ya diluidos al 1/2, colocar 100 µl por pocillo.

Para diluir directamente en los pocillos, colocar 50 µl del diluyente de la muestra (SD) más 50 µl de muestra.

Las muestras pueden ser probadas individualmente o en duplicado.

Las tiras deben colocarse siempre en el marco de modo que tanto el lavador como el lector puedan ser utilizados.

Cubrir los pocillos con un film adhesivo, cortar lo necesario para el número de tiras usadas.

Mezclar agitando suavemente la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas.

3. Incubación de la placa:

- Protocolo corto: 2 horas ± 5 min a +37 ± 3°C, o

- Protocolo largo: una noche (14-18 horas) a +5 ± 3°C.

LAVADO:

Solución de lavado: Diluir la solución concentrada de lavado (W) 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 concentrado (CJ) a 1/100 en el diluyente del conjugado (CD), 2 ml son necesarios para una tira, es decir, 20 µl de CJ en 1,980 ml de CD.

2. Distribución del conjugado:

Añadir 100 µl de conjugado diluido a todos los pocillos y cubrir con un nuevo trozo de film adhesivo.

3. Incubación del conjugado:

Incubar durante 30 ± 5 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 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 ± 5 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.

Limpiar con cuidado el fondo de los pocillos.

4. Medición de la densidad óptica:

Medir la densidad óptica (DO) bichromáticamente 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.

Referencia: SIBR1BN2.NE versión n°3 – 07/10/2010

Las partes en cursiva son las partes modificadas desde la última versión. Versión n°2 → n°3: Retirada de la indicación mezcla.

VII. PRUEBA DE VALIDACIÓN

Los resultados de cada ensayo son válidos si:

- La densidad óptica del control negativo (N) es > 0,5, y,
- El porcentaje de competencia del control positivo (P) es < 0,3.

Este porcentaje P/N se calcula del siguiente modo:

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

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

VIII. EXPRESIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

El ratio M/N se calcula del siguiente modo:

$$M / N = \frac{DO(M)}{DO(N)}$$

Interpretación de resultados

	M/N	0,5	0,55	
Suero, Plasma o Leche individual	+	+/-	-	Valores M/N

Todo **suero o plasma o leche individual** presentando un ratio M/N ≤ 0,5 es considerado como **positivo**.

Todo **suero o plasma o leche individual** presentando un ratio M/N > 0,55 es considerado como **negativo**.

Zona sospechosa: todo suero o plasma o leche **individual** presentando un ratio M/N situado en la ZONA SOSPECHOSA (entre 0,5 y 0,55) debe ser considerado como **sospechoso** y ser objeto de un nuevo control. Si el resultado sospechoso se mantenga, otro control será hecho después con otra muestra del mismo animal.

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

SÓLO PARA USO VETERINARIO /
PARA USO EXCLUSIVO IN VITRO

Instalación clasificada para la protección medioambiental