

SYNBIOTICS EUROPE SAS
2, rue Alexander Fleming
F- 69367 Lyon, Cedex 07

SERELISA[®] BVD p80 Ag Mono Indirect

**KIT PARA LA DETECCIÓN DEL ANTIGENO DEL VIRUS
DE BVD/MD/BD EN RUMIANTES INFECTADOS
PERMANENTEMENTE INMUNOTOLERANTES (I.P.I.)
(MUESTRA INDIVIDUAL)**

TÉCNICA INMUNO-ENZIMÁTICA INDIRECTA

192 reacciones de pocillo simple

I. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit SERELISA[®] BVD p80 Ag Mono Indirecto se basa en una técnica inmuno-enzimática indirecta de pocillo simple para la detección de un antígeno (p80/125 proteína no estructural), que posee un epítipo común para todas las cepas citopatógenas y no citopatógenas del virus BVD/MD/BD. La prueba es realizada directamente en muestras de suero, plasma y sangre entera, y permite la identificación de animales infectados permanentemente inmunotolerantes. Esta prueba también ha sido diseñada para analizar muestras de leucocitos, muescas de orejas y extractos de tejidos. Consta de cuatro pasos:

- Los controles y las muestras son colocados directamente en los pocillos sensibilizados con anticuerpos monoclonales anti-BVD/MD/BD [p80/125]. La proteína viral presente se fija a los sitios específicos.
- Después de un paso de lavado con el propósito de eliminar aquellas fracciones no ligadas, se añade un antisuero de conejo anti-BVD/MD/BD [p80/125]. Este se fija al antígeno previamente adherido a la fase sólida.
- Posterior a un segundo lavado, se agrega un conjugado de peroxidasa anti-Ig de conejo obtenido en cabra, permitiendo la revelación del antisuero de conejo anti-BVD/MD/BD [p80/125], formando el siguiente complejo:
(Mac) - (Ag BVD/MD/BD [p80/125]) - (anti-BVD/MD/BD [p80/125] Ig de Conejo) - (Ac cabra anti-conejo Ig / peroxidasa)
- Después de un tercer lavado, la enzima unida al complejo es revelada tras la adición de un sustrato que se transforma en un producto coloreado. Las densidades ópticas son leídas e interpretadas para determinar la presencia o ausencia del antígeno en función a los valores del umbral obtenidos del control positivo.

II. COMPOSICION Y CONSERVACIÓN DEL KIT

REACTIVOS	RECONSTITUCION Y CONSERVACION
2 microplacas conteniendo 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con anticuerpos monoclonales anti-BVD/MD/BD [p80/125]	Para usar dentro de los 3 meses siguientes a la apertura de la bolsa, la cual deberá cerrarse después de cada uso.
Conjugado antisuero de cabra anti-conejo Ig / peroxidasa (CJ), concentrado 10X	Diluir 10 veces en CD. Usar dentro de las 24 horas después de la dilución
Antisuero de conejo Anti-BVD/MD/BD [p80/125] (AS), concentrado 10X	Diluir 10 veces en CD. Usar dentro de las 24 horas después de la dilución
Sustrato peroxidasa tamponado (PS)	Listo para usar.
Control Negativo (N)	Listo para usar.
Control Positivo (P)	Listo para usar.
Diluyente de la muestra (SD)	Listo para usar.
Solución de lavado (W) (Concentrado 10X)	Diluir 10 veces en agua destilada o desmineralizada. Usar dentro de las 48 horas posteriores a la dilución
Diluyente del conjugado y antisuero (CD)	Listo para usar.
Solución detención - stop (S)	Listo para usar.
Film adhesivo	6 láminas

Nota: El kit y los reactivos diluidos deben almacenarse a + 5± 3°C y ser usados como se ha descrito previamente

III. MATERIALES Y REACTIVOS REQUERIDOS (NO PROVISTOS)

- Agua destilada o desmineralizada.
- Juego de pipetas o pipetas ajustables para medir entre 0 a 1000 µl. Se requiere una desviación de medida inferior a 10% para los volúmenes ≤10 µl e inferior a 5% para todos los otros volúmenes indicados.
- Probetas graduadas (100 ml y 1000 ml).
- Lavador de microplacas manual, automático o semiautomático.
- Lector de microplacas equipado con filtros para lectura bicromática a 450 nm y 630 nm. También es posible utilizar un lector monocromático equipado con un filtro de 450 nm.
- Incubadora a +37°C ± 3°C.

IV. PRECAUCIONES

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

- No mezclar o asociar reactivos procedente de KITS que llevan números de lote diferentes.
- No utilice los reactivos después de la fecha de vencimiento.
- Previo a su uso, coloque todos los reactivos a temperatura ambiente por lo menos durante 1 hora.
- Maneje todos los reactivos y muestras como si fuesen materiales biopeligrosos.
- Evite el contacto de los reactivos con la piel y los ojos. De ocurrir contacto, inmediatamente lávese el área afectada con agua fría.
- Nunca pipetear los reactivos con la boca.
- Evite la contaminación entre muestras durante la recolección, almacenamiento o transporte de las mismas. Las puntas de las pipetas deben cambiarse para cada muestra.
- Evite la contaminación de la solución de sustrato con iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes. Asegúrese que todos los recipientes estén limpios. No utilice el mismo recipiente o las mismas puntas para el conjugado y el sustrato.
- Se recomienda eliminar los reactivos y los materiales en contacto con los reactivos según la legislación vigente. Las fichas de seguridad del producto están disponibles bajo demanda.

Frases de riesgo y de seguridad:

- R35: Causa quemaduras graves
S26: En caso de contacto con los ojos, lávese inmediatamente y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S30: No echar jamás agua a este producto.
S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta)

V. MUESTRAS

La prueba se realiza en muestras de suero, plasma o sangre entera. Muestras de leucocitos, muescas de oreja y extractos de tejidos, también pueden ser analizadas. Las muestras deben ser almacenadas como se detalla a continuación:

Muestras	Refrigerado (+ 5°C)	Congelado (- 20°C)	Temperatura Lab. (+23°C)
Bovino: Suero, plasma o sangre entera con anticoagulante*	máx. 7 días	Sí	No
Sangre entera de ovinos y caprinos	máx. 7 días	Sí	No
Leucocitos**	máx. 48h	Sí	No
Extractos de tejidos**	máx. 48h	Sí	No
Muecas de oreja	máx. 48h	Sí	No

* Muestras estándar para animales de más de 6 meses

** Como fragmentos

NB:

- **Para animales menores de 6 meses de edad:** la reacción se realiza sobre extractos de coágulos de sangre, muescas de oreja o leucocitos (las técnicas para la preparación de extractos de coágulos, muescas de oreja y leucocitos son descritos al final del folleto).

- **Extractos de tejidos:** coágulos de sangre, órganos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, intestino): la técnica para la preparación del extracto de tejido ésta descrita al final del folleto.

VI. PROCEDIMIENTO

Cumpla estrictamente con el procedimiento descrito a continuación. Utilice controles negativos y positivos en duplicado para cada prueba realizada y/o para cada placa.

A. PASOS PRELIMINARES

Establecer cuidadosamente un plan de distribución e identificación de controles y muestras.

B. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

I - DISTRIBUCION DE CONTROLES Y MUESTRAS

1. Distribución de los controles:

Los controles vienen listo para su uso.

Después de agitar los frascos, agregue 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:

Las muestras de suero, plasma y sangre entera son analizadas después de una dilución 1:2 realizada directamente en los pocillos de prueba, usando 100 µl por pocillo: agregando 50 µl del diluyente de la muestra (SD) y 50 µl de la muestra a ser analizada.

Leucocitos: agregue 100 µl de la suspensión obtenida de los fragmentos de leucocito sin ninguna dilución posterior.

Extractos de tejido: agregue 100 µl del sobrenadante del extracto del tejido sin ninguna dilución posterior.

Muecas de oreja: agregue 100 µl del sobrenadante del extracto de la muesca de oreja sin ninguna dilución posterior.

Las muestras pueden ser analizadas individualmente o en duplicado.

Las tiras siempre deben colocarse sobre el marco porta tiras, de manera que tanto el lavador como el lector puedan ser utilizados.

Cubra los pocillos con el film adhesivo, cortado en el tamaño necesario para cubrir el número de tiras usadas.

Mezcle agitando suavemente la placa de forma manual o usando un agitador de placas.

3. Incubación de la placa

Incube la placa 2 horas ± 5 min. a +37 ± 3°C ó toda la noche (14-18 horas) a + 20 ± 5°C.

LAVADO:

Solución de lavado: diluya la solución concentrada de lavado (W) 1:10 en agua destilada o desmineralizada.

Retire cuidadosamente el film adhesivo y lave 4 veces.

II - ADICION DEL ANTISUERO

1. Preparación del antisuero:

Diluya el antisuero (AS) 1:10 con el diluyente del conjugado. La cantidad de dilución de AS requerido para cada tira 1ml: 100 µl de antisuero concentrado (AS) más 0.9 ml de diluyente de conjugado (CD).

2. Distribución del antisuero:

Agregue 100 µl del antisuero diluido a todos los pocillos y cubra con una nueva pieza de film adhesivo.

3. Incubación del antisuero:

Incube 1 hora ± 5 min. a +37 ± 3°C.

LAVADO:

Retire cuidadosamente el film adhesivo y lave 4 veces.

Advertencia:

La sangre provoca degradación del sustrato. Es esencial controlar la limpieza de los pocillos antes de agregar el sustrato y si es necesario, realizar dos o tres lavados adicionales con agua destilada o desmineralizada hasta eliminar los rastros de residuos de sangre en las paredes y el fondo de los pocillos.

III - ADICION DE CONJUGADO

1. Preparación del conjugado:

Prepare la solución del conjugado diluyendo el concentrado (CJ) 1:10 en el diluyente del conjugado (CD). Se necesita 1 ml de solución final para cada tira, lo que significa 100 µl de conjugado CJ en 0.9 ml de CD.

2. Distribución del conjugado:

Agregue 100 µl del conjugado diluido a todos los pocillos y cubra con una nueva pieza de la lamina adhesiva.

3. Incubación del conjugado:

Incube por 1 hora ± 5 min. a + 37 ± 3°C.

LAVADO:

Retire cuidadosamente el film adhesivo y lave 4 veces.

IV - REVELADO

1. Adición del sustrato:

Agregue 100 µl de sustrato peroxidasa tamponado (PS) a cada pocillo. No cubra con el film adhesivo durante esta etapa. Mezcle agitando suavemente la placa de forma manual, o bien utilizando un agitador de placas.

2. Incubación del sustrato:

Incube 30 ± 1 min. a temperatura de laboratorio (+20 ± 5°C), protegiendo de la luz.

3. Adición de la solución detención - stop:

Agregue 50 µl de solución detención - stop (S) a cada pocillo.

Mezcle agitando suavemente la placa de forma manual, o bien utilizando un agitador de placas. Asegúrese que los pocillos no tengan burbujas.

4. Medición de la densidad óptica:

Mida la densidad óptica (DO) bicromáticamente a 450 y 630 nm o monocromáticamente a 450 nm (en la banda amarilla).

Se recomiendan las lecturas bicromáticas. Si se utiliza un lector monocromático, asegúrese de limpiar el fondo de los pocillos previo a la lectura.

VII. VALIDACION DE LA PRUEBA

Los resultados de cada prueba son validos:

sí la densidad óptica (DO) obtenida con el control positivo es ≥ 0.300 , y

sí la densidad óptica (DO) obtenida con el control negativo es $< 0.50 \times DO P$.

VIII. EXPRESION E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Existen dos métodos posibles para el cálculo e interpretación de resultados excepto para las muescas de orejas:

Método 1: CALCULO DEL INDICE

Para cada muestra:

$$\text{Índice de la muestra} = 0.5 \times (\overline{DO} \text{ muestra} - \overline{DO} P)$$

\overline{DO} = Promedio de las densidades ópticas, si la prueba se ha realizado por duplicado.

$\overline{DO} P$ = Promedio de las densidades ópticas del control positivo.

Toda muestra de SUERO o PLASMA que presente un índice $\geq -0.15 \times \overline{DO} P$ es considerada como positiva.

Toda muestra de SUERO o PLASMA que presente un índice $< -0.3 \times \overline{DO} P$ es considerada como negativa.

Toda muestra de SANGRE que presente un índice $\geq -0.1 \times \overline{DO} P$ es considerada como positiva.

Toda muestra de SANGRE que presente un índice $< -0.25 \times \overline{DO} P$ es considerada como negativa.

Toda muestra de LEUCOCITOS o EXTRACTO DE TEJIDO que presente un índice $\geq 0.1 \times \overline{DO} P$ es considerada como positiva.

Toda muestra de LEUCOCITOS o EXTRACTO DE TEJIDO que presente un índice $< -0.1 \times \overline{DO} P$ es considerada como negativa.

Zona sospechosa:

Toda muestra de SUERO o PLASMA que presenta un índice situado en la ZONA SOSPECHOSA comprendida entre $-0.15 \times \overline{DO} P$ y $-0.3 \times \overline{DO} P$ deberá ser considerada como sospechosa o dudosa. Un control adicional deberá realizarse con el extracto de coágulo de la misma muestra o con una muestra tomada del mismo animal en días posteriores.

Toda muestra de SANGRE que presenta un índice situado en la ZONA SOSPECHOSA comprendida entre $-0.1 \times \overline{DO} P$ y $-0.25 \times \overline{DO} P$ deberá ser considerada como sospechosa o dudosa. Un control adicional deberá realizarse con la preparación de leucocitos de la misma muestra o con una muestra tomada del mismo animal en días posteriores.

Toda muestra de LEUCOCITOS o EXTRACTO DE TEJIDO que presenta un índice situado en la ZONA SOSPECHOSA comprendida entre $0.1 \times \overline{DO} P$ y $-0.1 \times \overline{DO} P$ deberá ser considerada como sospechosa o dudosa. Un control adicional deberá realizarse con la preparación de leucocitos de una muestra tomada del mismo animal en días posteriores.

Muestras positivas:

Cualquier resultado positivo es considerado indicativo de un animal virémico persistente; dos resultados positivos (3-4 semanas después) son necesarios para confirmar que un animal está persistentemente infectado con el virus de BVD/MD/BD.

Nota: Un resultado positivo puede ser obtenido por un animal transitoriamente virémico (y potencialmente de un animal recientemente vacunado con una vacuna de BVD/MD/BD de virus vivo modificado).

Observaciones:

- En animales IPI con una edad menor a los seis meses, residuos de anticuerpos maternos en muestras de sangre entera pueden conducir a resultados de falsos negativos o sospechosos. En este caso, es necesario realizar una prueba en muestras de LEUCOCITOS o EXTRACTO DE COAGULO.

- Anticuerpos presentes en muestras de suero o plasma pueden conducir a resultados de falsos negativos o sospechosos en animales infectados con enfermedad de las mucosas. En este caso, es recomendable realizar la prueba en muestras de LEUCOCITOS o EXTRACTO DE COAGULO.

Método 2: ANALISIS DE LAS DENSIDADES OPTICAS

- Calcule el punto de corte de las DOs (DO PC 40, DO PC 50, DO PC 70, DO PC 80 y DO PC 120) correspondientes al 40%, 50%, 70%, 80% y 120% de la densidad óptica del control positivo (DO CP).

$$\begin{aligned} \text{DO PC 40} &= 0.40 \times \overline{DO} P \\ \text{DO PC 50} &= 0.50 \times \overline{DO} P \\ \text{DO PC 70} &= 0.70 \times \overline{DO} P \\ \text{DO PC 80} &= 0.80 \times \overline{DO} P \\ \text{DO PC 120} &= 1.20 \times \overline{DO} P \end{aligned}$$

- Compare cada una de las DOs obtenidas de las muestras de suero o plasma con la DO PC 40 y la DO PC 70.

- Compare cada una de las DOs obtenidas de las muestras de sangre con la DO PC 50 y la DO PC 80.

- Compare cada una de las DOs obtenidas de las muestras de leucocitos y los extractos de tejidos con la DO PC 80 y la DO PC 120.

Interpretación de resultados:

		DO PC 40	DO PC 70	DO Muestra
Suero / plasma	-	+/-	+	+

		DO PC 50	DO PC 80	DO Muestra
Sangre	-	+/-	+	+

		DO PC 80	DO PC 120	DO Muestra
Extracto tejidos LEUCOCITOS	-	+/-	+	+

EXPRESION E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS para las muescas de orejas

- Calcular para cada muestra, el M/P corregido
- Un M/P mayor o igual de 0.5 es positivo y menor de 0.5 es negativo.

El M/P es calculado de la manera siguiente:

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

\overline{DO} = promedio de las densidades ópticas

RESULTADOS

		M/P 0.5
Muesca de oreja	-	+
		Valores M/P

MUESCA DE OREJA

Preparación de las muescas de oreja:

Materiales:

- Muesca de oreja
- Tubo de hemólisis de 5ml
- Mezcladora vortex
- Congelador
- Tampón fosfatado (pH neutro)

Método:

- Recolectar muescas de oreja (5x5 ± 1 o 2 mm).
- Recuperar cada muesca en 1 ml de tampón fosfatado.
- Realizar un ciclo de congelación/descongelación.
- Realizar una prueba con 100 µl del sobrenadante directamente en el kit.

TÉCNICA PARA LA PREPARACION DE LEUCOCITOS EN MUESTRAS DE SANGRE ENTERA

Materiales:

- Muestra de sangre con anticoagulante (preferiblemente heparina) sin congelación previa.
- Tubos de hemólisis de 5 ml
- Pipeta de 5 ml
- Mezclador vortex
- Centrifuga
- Tampón de hemólisis:
 - NH4 Cl: 16.6 g
 - NaH CO3: 2.0 g
 - diNa EDTA: 0.185 g
 - 1000 ml de agua destilada o desmineralizada
 - pH 7.2 - 7.4

Conservar a + 5 ± 3°C.

Método:

- Agregue un volumen (2 ml) de tampón de hemólisis a los tubos de hemólisis.
- Agregue un volumen igual (2 ml) de la muestra de sangre.
- Mezcle bien, utilizando un mezclador Vortex.
- Incube 5 -15 minutos a temperatura ambiente para obtener una lisis completa de las células rojas de la sangre.
- Centrifugue por 15 minutos a 1000 rpm.
- Elimine el sobrenadante vaciando el contenido del tubo y golpeando suavemente el tubo sobre un papel absorbente.
- Re-suspenda las partículas de leucocitos por agitación en 200 µl de diluyente de la muestra (DM), usando un mezclador vortex.
- Use 100 µl de la suspensión de leucocitos sin ninguna dilución posterior para el desarrollo de la prueba.

TÉCNICA PARA LA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE TEJIDOS

Materiales:

- Tejidos:
 - coágulos sanguíneos (tubos secos) posterior a la exudación del suero
 - órganos: bazo, nudos linfoides, intestino, pulmón (preferiblemente se selecciona un órgano linfoide)
- Tubos de hemólisis de 5 ml
- Tijeras o bisturí
- Mezclador vortex
- Centrifuga
- Diluyente de la muestra (SD) proporcionado en el kit SERELISA BVD p80 Ag Mono Indirect.

Método:

- Coágulos sanguíneos: descarte el suero y agregue 1 ml del diluyente de la muestra (SD) suministrado en el kit.
- Órganos :
 - Separar de 0.5 a 1.0 cm3 de tejido.
 - Corte el tejido en pequeñas piezas (usando tijeras o bisturí).
 - Agregue 1 ml del diluyente de la muestra (SD) suministrado en el kit.
- Homogenice (haciendo uso de un vortex).
- Incube por 30 minutos a temperatura ambiente (+20 ± 5°C) preferiblemente con agitación.
- Centrifugue por 15 minutos a 1000 rpm.
- Recupere el sobrenadante.
- Agregue 100 µl del sobrenadante recuperado directamente a los pocillos sin ninguna dilución posterior.

Referencia:

Mignon B., Waxweiler S., Thiry E., Boulanger D., Dubuisson J. and Pastoret P.P.
1992 J. Virol. Methods, 40; 85-94.

Si tiene alguna consulta, por favor contáctenos:
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
69367 LYON Cedex 07 – France
Tel: +33 4.72.76.11.11 - Fax: +33 4.72.76.11.10
www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

PARA USO VETERINARIO SOLAMENTE /
PARA USO IN VITRO SOLAMENTE

Instalación clasificada para la protección medioambiental