

## SERELISA<sup>®</sup> M. hyop Ab Mono Blocking

### KIT PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE EN SUERO Y PLASMA DE CERDOS (INDIVIDUALES)

#### TÉCNICA INMUNO-ENZIMÁTICA DE BLOQUEO 384 reacciones de pocillo simple

#### I. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit SERELISA<sup>®</sup> M. hyop Ab Mono Blocking de detección de anticuerpos es una técnica inmuno-enzimática de bloqueo que utiliza pocillos individuales para la detección de anticuerpos contra una proteína de la membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Hay tres pasos:

1. Cada muestra de suero o plasma se coloca en un pocillo individual sensibilizado con la proteína de la membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Los anticuerpos presentes en la muestra se fijan de modo específico al antígeno de recubrimiento de los pocillos.

2. Se añade un conjugado anticuerpo monoclonal (AcM) anti-proteína/peroxidada. Este anticuerpo monoclonal se fija en los sitios que se quedaron libres, formando un complejo:  
(Ag) - (AcM anti-proteína / peroxidasa).

3. El exceso de conjugado se elimina por un paso de lavado. La enzima unida al complejo 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 la ausencia de anticuerpos en la muestra, se observa una reacción con una intensa coloración debida a la fijación del conjugado a los sitios antigénicos de la fase sólida.  
- En la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en la muestra, menor cantidad de la enzima conjugada se une a los sitios antigénicos de la fase sólida y por lo tanto la reacción de color es 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 la proteína de la membrana de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	Para usar dentro de las 4 semanas 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 después de la dilución.
Diluyente rosado de las muestras (SD). Aparición posible de un precipitado sin influencia.	Listo para usar.
Control negativo (N)	Listo para usar.
Control positivo (P)	Listo para usar.
Diluyente del conjugado azul (CD)	Listo para usar.
Conjugado (concentrado 100X) AcM anti-proteína/ peroxidasa (CJ)	Diluir 100 veces en el CD. <b>Usar dentro de 4 horas después de la dilución.</b>
Sustrato de peroxidasa (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 ± 3°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 µl. La desviación de medición debe ser ≤ 10% para volúmenes ≤ 10 µl y ≤ 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.

#### 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 to use.
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:

R 23/25: Tóxico por inhalación y digestión.

R 35: Provoca quemaduras graves.

R 36/37/38: Irritando los ojos, las vías respiratorias y la piel.

R 41: Riesgo de lesiones oculares graves.

R 42/43: Se puede llevar una sensibilización por inhalación y contacto con la piel.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávase 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.

#### V. MUESTRAS

La prueba se realiza en suero o plasma individual, diluido al 1/2 en el diluyente de las muestras (SD).

Las muestras deben mantenerse como sigue:

Muestras	Refrigeración (+5°C)	Congelación (-20°C)	Temperatura ambiental (+23°C)
Suero, Plasma	Máx. 7 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 de suero o plasma que deben ser analizadas. Las diluciones pueden ser realizadas, o bien de antemano en los tubos de hemólisis, o directamente en los pocillos de prueba.

## 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 y plasmas ya diluidos al 1/2, colocar 100 µl por pocillo.

Para diluir directamente en los pocillos, colocar 50 µl del diluyente de las muestras (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 las muestras y de los controles:

Incubar durante 45 ± 2 min a +23 ± 5°C.

**!!! NUNCA LAVAR DESPUES INCUBACION  
NI RECHAZAR EL LÍQUIDO**

### 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), 1 ml son necesarios para una tira, es decir, 10 µl de CJ en 0,99 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.

Mezclar agitando la placa de forma manual o utilizando un agitador de placas para asegurar una correcta mezcla.

#### 3. Incubación del conjugado:

Incubar durante 30 ± 2 min a +23 ± 5°C.

#### LAVADO:

Preparar la cantidad necesaria de solución de lavado (W) al 1/10 en agua destilada o desmineralizada.

Retirar con cuidado el film adhesivo y lavar 4 veces.

### III - REVELADO

#### 1. Adición del sustrato de peroxidasa:

Añadir 100 µl del sustrato de peroxidasa (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 ± 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. 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.

## VII. VALIDACIÓN DE PRUEBA

Los resultados de cada ensayo son válidos si:

- La densidad óptica del control negativo (A1, A2) es > 0,700.
- El ratio del promedio de la DO del control positivo (B1, B2) es < 0,5.

El ratio P/N se calcula del modo siguiente:

$$P/N = \frac{\overline{DOP}}{\overline{DON}}$$

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

## VIII. EXPRESION E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- Dividir la DO de la muestra por la DO N para obtener el ratio Muestra/Negativo (M/N).
- Realizar un promedio de las DO en el momento de varios depósitos de la misma muestra.
- Cuando el ratio M/N es superior a 0,5, la muestra es negativa, y viceversa cuando es inferior o igual a 0,5, la muestra es positiva.

El ratio M/N se calcula del siguiente modo:

$$M/N = \frac{DO_{muestra}}{\overline{DON}}$$

#### Interpretación de los resultados:

Suero o plasma	+	0,5	-
			valores M/N

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