

## SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking

### KIT PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PCV2 (CIRCOVIRUS PORCINO DE TIPO 2) EN HECES Y SUEROS DE PORCINOS (INDIVIDUALES)

#### MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO MÉTODO CUALITATIVO EN SUERO Y HECES

#### TÉCNICA INMUNO-ENZIMÁTICA DE BLOQUEO

384 reacciones de pocillo simple

#### I. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking se basa en una técnica inmuno-enzimática de bloqueo que permite la detección de anticuerpos anti-circovirus de tipo 2 (PCV2=Porcine Circo Virus del tipo 2) en las heces (protocolo 1) y sueros de porcinos (protocolo 2). Consiste en tres pasos:

1. Cada control y cada muestra se distribuye en un pocillo sensibilizado con los anticuerpos (Ac1) anti-PCV2 en los cuales se fija el antígeno (Ag) PCV2. Los anticuerpos anti-Ag PCV2 quizás presentes en la muestra se fijan de modo específico al antígeno.

2. Después de un paso de lavado, un conjugado específico del antígeno PCV2 marcado a la peroxidasa (Conj-HRP) se añade. Este se fija en los sitios que se quedaron libres, formando un complejo:



3. El exceso de conjugado es eliminado después de un paso de lavado. 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 según valores umbrales calculadas en los sitios antigénicos a partir de los controles. La presencia o la ausencia de anticuerpos se determina a partir de los umbrales.

#### II. COMPOSICIÓN Y CONSERVACIÓN DEL KIT

REACTIVOS	RECONSTITUCIÓN Y CONSERVACIÓN
4 microplacas conteniendo 6 tiras de 16 pocillos sensibilizados con los Ac anti-PCV2 en los cuales se fija el Ag PCV2.	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. Usar dentro de las 48h después de la dilución.
Diluyente de la muestra (SD)	Listo para usar
Control Negativo (N)	Listo para usar.
Control Positivo (P)	Listo para usar.
Diluyente del conjugado (CD)	Listo para usar.
Conjugado: Ac anti-Ag PCV2 marcado a la peroxidasa (concentrado) (CJ)	Diluir 100 veces en CD. <b>Usar dentro de las 24 horas después de la dilución.</b>
Substrato 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.

#### 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 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  $+37 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- Vasijas para tomas y escobillones.

#### 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 de utilizar.
- Manipular todos los reactivos y muestras como materia 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:

R 23/25: Tóxico por inhalación y por ingestión.

R 35: Provoca quemaduras graves.

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

R 41: Riesgo de lesiones oculares graves.

R 42/43: Posibilidad de sensibilización por inhalación y por contacto con la piel.

S 7: Manténgase el recipiente bien cerrado.

S 24: Evítese el contacto con la piel.

S 26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S 30: No echar jamás agua a este producto.

S 45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si posible, muéstrele la etiqueta).

#### V. MUESTRAS

##### V. (1) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO TRES DILUCIONES

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos, en tres pocillos, al 1/100, 1/1000 y 1/10000 en el diluyente de la muestra (SD).

Cada muestra se compara a un modelo lineal, usando un modelo de regresión logística y una interpolación entre los tres resultados, correlacionado a un título (ver la interpretación para los detalles del modelo).

##### A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.

2. Para la titración de sueros, una gama de pre-diluciones para cada suero debe ser realizada en los tubos, seguida por una dilución al 1/10 en placa. La preparación de la gama de predilución para cada suero debe ser la siguiente:

Predilución	Preparación
1/10	10 µl de suero + 90 µl diluyente de la muestra SD
1/100	10 µl de suero prediluido 1/10 + 90 µl SD
1/1000	10 µl de suero prediluido de 1/100 + 90 µl SD

## B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

### 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, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (**P**) a los pocillos B1, B2 y B3.

### 2. Distribución de las muestras:

Realizar una dilución al 1/10 en placa: colocar 90 µl de diluyente (**SD**) y 10 µl de cada predilución (1/10, 1/100, 1/1000) para cada de los sueros a probar.

	1	2	3	4	5	6
A	NC	NC	NC	S7 - 1:100	S7 - 1:1000	S7 - 1:10000
B	PC	PC	PC	S8 - 1:100	S8 - 1:1000	S8 - 1:10000
C	S1 - 1:100	S1 - 1:1000	S1 - 1:10000	S9 - 1:100	S9 - 1:1000	S9 - 1:10000
D	S2 - 1:100	S2 - 1:1000	S2 - 1:10000	S10 - 1:100	S10 - 1:1000	S10 - 1:10000
E	S3 - 1:100	S3 - 1:1000	S3 - 1:10000	S11 - 1:100	S11 - 1:1000	S11 - 1:10000
F	S4 - 1:100	S4 - 1:1000	S4 - 1:10000	S12 - 1:100	S12 - 1:1000	S12 - 1:10000
G	S5 - 1:100	S5 - 1:1000	S5 - 1:10000	S13 - 1:100	S13 - 1:1000	S13 - 1:10000
H	S6 - 1:100	S6 - 1:1000	S6 - 1:10000	S14 - 1:100	S14 - 1:1000	S14 - 1:10000

Ir a la etapa VI: PROCEDIMIENTO

## V. (2) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO UNA DILUCIÓN ÚNICA

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos en un pocillo a 1/1000 con el diluyente de la muestra (**SD**).

La densidad óptica seguida de la lectura de la placa será transformada en un título según una ecuación precisa (ver la interpretación para los detalles del modelo).

### A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.

2. Para la titración de sueros, cada suero es diluido al 1/10 en tubos, seguido de una dilución a 1/10 en placa.

La preparación de la gama de predilución para cada suero debe ser la siguiente:

Dilución	Preparación
1/10	10 µl de suero + 90 µl diluyente de la muestra SD
1/100	10 µl de suero prediluido 1/10 + 90 µl SD

## B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

### 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, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (**P**) a los pocillos B1, B2 y B3.

### 2. Distribución de las muestras:

Realizar una dilución al 1/10 en placa: colocar 90 µl de diluyente (**SD**) y 10 µl de cada predilución al 1/100 para cada de los sueros a probar.

	1	2	3	4	5	6
A	N	N	N	S19 - 1:1000	S27 - 1:1000	S35 - 1:1000
B	P	P	P	S20 - 1:1000	S28 - 1:1000	S36 - 1:1000
C	S1 - 1:1000	S7 - 1:1000	S13 - 1:1000	S21 - 1:1000	S29 - 1:1000	S37 - 1:1000
D	S2 - 1:1000	S8 - 1:1000	S14 - 1:1000	S22 - 1:1000	S30 - 1:1000	S38 - 1:1000
E	S3 - 1:1000	S9 - 1:1000	S15 - 1:1000	S23 - 1:1000	S31 - 1:1000	S39 - 1:1000
F	S4 - 1:1000	S10 - 1:1000	S16 - 1:1000	S24 - 1:1000	S32 - 1:1000	S40 - 1:1000
G	S5 - 1:1000	S11 - 1:1000	S17 - 1:1000	S25 - 1:1000	S33 - 1:1000	S41 - 1:1000
H	S6 - 1:1000	S12 - 1:1000	S18 - 1:1000	S26 - 1:1000	S34 - 1:1000	S42 - 1:1000

Ir a la etapa VI: PROCEDIMIENTO

## V. (3) MÉTODO CUALITATIVO EN SUERO

La prueba se realiza en sueros individuales diluidos al 1/100 en el diluyente de la muestra (SD).

### A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.

2. Para la titración de sueros, una predilución al 1/10 se realiza en tubo de hemólisis. Una dilución al 1/10 de esta predilución se realiza después en placa.

## B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

### 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, A2 y A3 y 100 µl de control positivo (**P**) a los pocillos B1, B2 y B3.

### 2. Distribución de las muestras:

Colocar 100 µl de las muestras diluidas a 1/100 por pocillo.

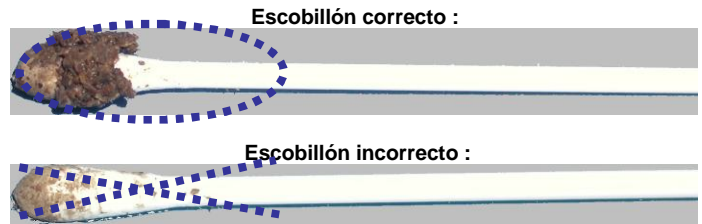
En el caso de dilución directa en el pocillo, colocar 90 µl del diluyente pues 10 µl de suero prediluido al 1/10.

Las muestras pueden ser probadas individualmente o en duplicado y la distribución se realiza en columna.

Ir a la etapa VI: PROCEDIMIENTO

## V. (4) MÉTODO CUALITATIVO EN HECES

La prueba se realiza en heces (toma hecha con un guante sobre el animal y preparación en laboratorio). Un escobillón de heces (más o menos 0,15 g de heces) se pone en 500 µl de diluyente de la muestra (**SD**) y esta centrifugado a 1500 g durante 15 minutos. Recuperar lo que sobrenada.



### A. PASOS PRELIMINARES

1. Cuidadosamente configurar la distribución y la identificación de los controles y muestras.

2. Preparar las muestras de heces a analizar. Eventualmente prediluir las muestras al 1/10 en tubo de hemólisis o en microplaca virgen. Las muestras pueden ser diluidas directamente en los pocillos.

## B. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

### 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 caso de extracto de heces previamente diluidos a 1/10, colocar 100 µl por pocillo.

En el caso de dilución directa en el pocillo, colocar 90 µl del diluyente pues 10 µl de extracto de heces.

Las muestras pueden ser probadas individualmente o en duplicado y la distribución se realiza en columna.

Ir a la etapa VI: PROCEDIMIENTO

Las muestras deben ser conservadas como sigue:

Muestras	Frío (+ 5°C)	Congelación (- 20°C)	Temperatura ambiente (+23°C)
Suero	max. 7 días	Sí	No
Heces (antes de la preparación)	max. 7 días	Sí	max. 3 días
Extracto de Heces	No	Sí	No

## VI. PROCEDIMIENTO

### I - INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LOS CONTROLES

- Las tiras deben colocarse siempre en el marco durante la fase de lavado y la lectura de las densidades ópticas.
- 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.

#### Incubación de la placa

1 hora ± 5 min a 37 ± 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 concentrado (**CJ**) a 1/100 en el diluyente del conjugado (**CD**) (1 ml es necesario para una tira, es decir, 10 µl de **CJ** en 990 µl 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:

1 hora ± 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:

Incubar 30 ± 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) 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. PRUEBA DE VALIDACIÓN

Los resultados de cada ensayo son válidos:

si la  $\overline{DO}$  del control negativo (N) es > 0,800, y

si la  $\overline{DO}$  del control positivo (P) es < 0,500

## VIII. EXPRESIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### VIII.(1) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO TRES DILUCIONES

El método de cálculo y de interpretación se basa en el modelo siguiente:

$$\text{Log}(\text{Titulo}) = a + b \times \text{Logit}(\text{SNc}), o$$

$$\text{Titulo} = 10^{(a+b \times \text{Logit}(\text{SNc}))}$$

Con

$$\text{SNc} = \frac{\overline{DO(S)} - \overline{DO(P)}}{\overline{DO(N)} - \overline{DO(P)}}, a = 2,5, \text{ et } b = -0,70$$

Cada ratio corregido, muestra dividida por el control negativo (SNc) se calcula para cada pocillo y se nota  $\text{SNc}_{(\text{dilution})}$ . Para cada muestra, se usa el árbol de decisión siguiente:

- si  $\text{SNc}_{(1:10000)} < 0,0976$ , entonces el título > 15 000 Eu (unidad ELISA)
- si  $0,7437 > \text{SNc}_{(1:10000)} > 0,0976$  entonces

$$\text{Titulo} = 10 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(\text{SNc}_{(1:10000)})}$$

- si  $\text{SNc}_{(1:10000)} > 0,7437$ , entonces

- si  $\text{SNc}_{(1:1000)} < 0,7437$ , entonces

$$\text{Titulo} = 10^{a+b \times \text{Logit}(\text{SNc}_{(1:1000)})}$$

- si  $\text{SNc}_{(1:1000)} > 0,7437$ , entonces

- si  $\text{SNc}_{(1:100)} < 0,95$ , entonces

$$\text{Titulo} = 0.1 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(\text{SNc}_{(1:100)})}$$

- si  $\text{SNc}_{(1:100)} > 0,95$ , entonces

$$\text{Titulo} = 0$$

El uso de una hoja de cálculo es aconsejado. Se puede solicitar a Synbiotics un fichero Excel pre-formateado.

### VIII.(2) MÉTODO CUANTITATIVO EN SUERO USANDO UNA DILUCIÓN ÚNICA

Cuando se utiliza el método con una dilución única, se hace el cálculo siguiente:

- si  $\text{SNc}_{(1:1000)} < 0,7437$ , entonces

$$\text{Título} = 10^{a+b \times \text{Logit}(\text{SNc}_{(1:1000)})}$$

- si  $\text{SNc}_{(1:1000)} < 0,051$ , entonces

$$\text{Título} = +2484$$

- si  $\text{SNc}_{(1:1000)} > 0,7437$ , entonces

$$\text{Título} \leq 150$$

El uso de una hoja de cálculo es aconsejado. Se puede solicitar a Synbiotics un fichero Excel pre-formateado.

### VIII.(3) MÉTODO CUALITATIVO EN SUERO

El método de cálculo y de interpretación es el siguiente:

- Calcular para cada muestra el ratio S/N
- Calcular el promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

Este S/N se calcula según la fórmula siguiente:

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

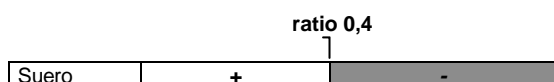
$\overline{DO}$  muestra = Promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

$\overline{DO}$  N = Promedio de las densidades ópticas del control negativo.

Cada muestra presentando un ratio  $\leq 0,4$  es considerada como **positiva** para la presencia de anticuerpos en el suero.

Cada muestra presentando un ratio  $> 0,4$  es considerada como **negativa** para la presencia de anticuerpos en el suero.

#### Interpretación de los resultados



### VIII.(4) MÉTODO CUANTITATIVO EN HECES

#### Método por el cálculo de los ratios:

Para cada muestra:

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

$\overline{DO}$  muestra = Promedio de las densidades ópticas de la muestra, si la prueba se realiza por duplicado.

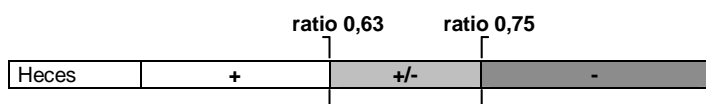
$\overline{DO}$  N = Promedio de las densidades ópticas del control negativo.

Cada muestra presentando un ratio  $\leq 0,63$  es considerada como **positiva** para la presencia de anticuerpos en las heces.

Cada muestra presentando  $0,63 < \text{ratio} < 0,75$  es considerada como **sospechosa** para la presencia de anticuerpos en las heces.

Cada muestra presentando un ratio  $\geq 0,75$  es considerada como **negativa** para la presencia de anticuerpos en las heces.

#### Interpretación de los resultados



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 - 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