

SERELISA® PRV gl Ab Mono Blocking

KIT PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY (PRV) EN CERDOS (INDIVIDUAL)

TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA DE BLOQUEO 384 reacciones de pocillo simple

El kit SERELISA® PRV gl Ab tiene como objetivo:

- La discriminación entre los cerdos infectados y no infectados en una población vacunada con vacuna de gl-suprimida del la vacuna de Aujeszky (gl-);
- La identificación de los cerdos infectados en una población no vacunada.

I. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

La prueba del kit SERELISA® PRV gl Ab Mono blocking es una técnica inmunoenzimática de bloqueo que permite la detección de anticuerpos anti-glicoproteína (gl) en los cerdos. Consiste en tres pasos:

1. Cada muestra se coloca en un pocillo sensibilizado con glicoproteínas de envoltura de PRV. Los anticuerpos anti-gl presentes en la muestra se unen al antígeno de la glicoproteína viral recubiertos de los pocillos.

2. Después de un paso de lavado, un conjugado anticuerpo monoclonal (AcM) anti-gl/peroxidasa se añade. Este se fija en los sitios de gl que quedaron libres, formando un complejo:
(Ag glicoproteína sobre PRV) - (AcM anti-gl/peroxidasa)

3. El exceso de conjugado es eliminado a través de un segundo 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 se registran y se interpretan en función los umbrales obtenidos por los controles:

- En ausencia de anticuerpos anti-gl en la muestra, un color intenso de reacción se observa debida a la fijación del conjugado a los sitios antigénicos de la fase sólida.
- En presencia de anticuerpos anti-gl 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 con 6 tiras de 2 x 8 pocillos sensibilizados con glicoproteínas de la envoltura del PRV.	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 de la muestra (SD)	Listo para usar.
Control negativo (N)	Listo para usar.
Control positivo (P)	Listo para usar.
Diluyente Conjugado (CD)	Listo para usar.
Conjugado (concentrado 10x) AcM anti-gl/peroxidase	Diluir 10 veces en el CD. Usar dentro de 24 horas después de la dilución.
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 $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ 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 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 $+37^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

IV. PRECAUCIONES 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.
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.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con abundante agua y buscar atención médica.

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 decantado diluido 1/2 en el diluyente de la muestra (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. Use 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 Controles:

Los controles están listos para su uso.

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 la placa de las muestras y de los controles:

Incubar la placa durante una noche (14-18 horas) a +5 ± 3°C, o durante 2 horas ± 5 min a +37 ± 3°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.

II - ADICIÓN DEL CONJUGADA

1. Preparación del conjugado:

Preparar la solución conjugada diluyendo el concentrado (**CJ**) 1/10 en el diluyente del conjugado (**CD**), 2 ml son necesarios para una tira, es decir, 200 µl de **CJ** en 1,8 ml de **CD**.

2. La 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 1 hora ± 5 min a +37 ± 3°C.

LAVADO:

Retire 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:

30 ± 5 min a temperatura de laboratorio (+23 ± 5°C), protegido de la luz.

3. Adición de la solución de parada:

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.

4. Medición de la densidad óptica:

Medir la densidad óptica (DO) bichromáticamente a 450 nm 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:

- El promedio de la densidad óptica del control negativo (N) es ≥ 0,500, y,
- El porcentaje de competencia del control positivo (P) es ≥ 80%.

Este porcentaje se calcula de la siguiente manera:

$$\% P = \frac{\overline{DON} - \overline{DOP}}{\overline{DON}} \times 100$$

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

VIII. EXPRESIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se puede usar dos métodos para el cálculo y la interpretación. Se aconseja el primero para comparar y acumular los resultados obtenidos de placas distintas durante diferentes pruebas.

Método 1: CÁLCULACION DE LOS PORCENTAJES DE COMPETENCIA (% de la muestra)

Realizar un promedio de las DO en el caso de varios depósitos de la misma muestras.

Para cada muestra (M):

$$\% M = \frac{\overline{DON} - \overline{DOM}}{\overline{DON} - \overline{DOP}} \times 100$$

Interpretación:

MUESTRAS	NEGATIVO	SOSPECHOSO	POSITIVO
Suero / plasma	%M < 40 %	40 % ≤ %M < 50 %	%M ≥ 50 %

Método 2: ANALISIS DE DENSIDADES OPTICAS

Calcular las DOs correspondientes a 40% y 50% de competencia y comparar cada una de las DOs de las muestras a las DO umbrales.

DO umbral 40% = 0,60 \overline{DO} N + 0,40 \overline{DO} P

DO umbral 50% = 0,50 \overline{DO} N + 0,50 \overline{DO} P

Interpretación:

	DO S 50	DO S 40	
Suero, plasma	+	+/-	-
			DO Muestra

- Las muestras positivas corresponden a los porcinos infectados o a los porcinos vacunados con una cepa del virus de la enfermedad de Aujeszky (gl+).

- Las muestras negativas corresponden a los porcinos no infectados, quizás vacunados con una vacuna deletada (gl-).

- Las muestras consideradas como sospechosas tienen que 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 - 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