



# VMRD, INC

## Kit Test Virus-Anticuerpo Anemia Infecciosa Equina

USDA Código producto E 515.21  
Certificado SENASA No.08-001  
Uso profesional exclusivo

### Información general

El test de inmunodifusión (ID) del virus de la anemia infecciosa Equina (VAIE) detecta anticuerpos precipitantes, en el suero de los equinos (familia Equidae) contra la proteína del core purificada, recombinante, de la AIE de peso molecular 26.000 (p26). Las muestras de los sueros, si son positivas, formarán una línea que se funde con la línea correspondiente al control positivo o que desvía la línea correspondiente al control positivo, próxima al pocillo de muestra sin formación de una línea visible. Por el contrario los sueros negativos no forman ni la línea que se funde con la del control positivo de referencia ni tampoco la desviación de las líneas del control positivo.

### Contenido del kit

1 Frasco A	Antígeno p26 de la AIE	3,35 ml
1 Frasco R	Suero de Referencia de control positivo	10,00 ml

Estos reactivos son suficientes para realizar hasta 200 test.

### Precauciones

No use componentes de otros kits. Almacenar a 2-7° C. Los reactivos contienen 0.09 % de azida sódica. Usar equipamiento limpio para evitar contaminación de los reactivos.

### Equipos y materiales necesarios

Dispositivo eléctrico con plato de calentamiento, autoclave o microondas, balanza, sacabocado. Frascos de 250 ml, pipetas de laboratorio, refrigerador, bomba de vacío o bomba de vacío de agua, micropipetas, tips de micropipetas descartables, cajas de plástico con tapa, fuente de luz de elevada intensidad de rayo fino. Baño de agua a 45° C (deseable, pero no necesario). Agar noble, NaOH, ácido bórico, agua destilada o de ionizada. Placas de Petri de 100 mm de diámetro o trays de plástico de 45x90 mm.

### Preparación del gel de agar

1. Prepare el buffer borato mezclando 2 g de OHNa y 9 g de ácido bórico en 1 litro de agua destilada. El pH resultante debe ser aproximadamente de 8.6
2. Prepare una solución al 1 % de agar noble en buffer borato
3. Lleve la solución a ebullición hasta su disolución y luego en autoclave a 15 lbs, 121° C durante 7 minutos. Alternativamente utilice el microondas a intervalos de 30 segundos durante aproximadamente 3 minutos o hasta que el agar se haya disuelto completamente.
4. Enfrie la solución a 45° C y luego transfiera 15 ml de la solución a una caja de Petri de 100 mm de diámetro. El agar debe tener un espesor de 2.8 mm.
5. Permita que el agar se enfríe en un ambiente relativamente libre de polvo.

Se debe sacar la tapa durante el enfriamiento para permitir el escape del vapor de agua. Para obtener mejores resultados, nosotros recomendamos que las placas recién preparadas sean mantenidas durante la noche a 2-7° C antes de usar. Las placas a las cuales no se les ha realizado el corte de los pocillos pueden guardarse invertidas a 2-7° C en bolsas cerradas hasta durante una semana. Antes de usarlo el agar almacenado debe controlarse para asegurarse que no se haya secado ni se encuentre recubierto con humedad.

### Preparación del esquema de trabajo en la placa de agarosa

Se emplea un esquema de siete pocillos con uno en el centro y los seis restantes en círculo alrededor de él.

Los pocillos deben estar a una distancia entre sí de 2.4 mm y tener 5.3 mm de diámetro. El agar debe cortarse cuando se ha endurecido suficientemente de tal manera que los pocillos no se rompan cuando se remueva la porción correspondiente de agar. Succionar el agar de los pocillos empleando un metal o una cánula de vidrio con una abertura de 1-2 mm de diámetro, conectada a una línea de vacío. Debe tenerse especial cuidado de no separar el agar de la placa.

Si se observa humedad en los pocillos, antes de la introducción de los reactivos y muestras, debe ser eliminado por succión o permitir su evaporación. Las placas de petri deben usarse el mismo día en el que se han realizado los cortes de los pocillos

#### Llenado de los pocillos e incubación de las placas de agar

El antígeno A (50 ul) se coloca en el pocillo del centro con una micropipeta. 50 ul del suero control positivo de referencia R se colocan en el pocillo a cada lado de la muestra(s) a ser estudiada (Figura 1). Esta forma de ubicación permite tener una línea de control positiva a cada uno de los lados del suero en estudio, facilitando la exacta determinación de la identidad de las líneas. Un total de tres muestras pueden estudiarse en cada uno de los diseños preparados para el trabajo, usando igualmente 50 ul para cada pocillo.

La muestra para ser estudiada puede ser tanto suero como plasma, sin embargo, se advierte que algunos anticoagulantes pueden producir turbiedad alrededor del pocillo que contiene plasma.

Los pocillos deben estar llenos con sus respectivos reactivos a nivel de la superficie del agar no permitiendo la formación de meniscos.

Tanto el suero como el antígeno no deben escurrirse sobre la superficie del agar.

Permita que las placas estén en reposo unos minutos antes de moverlas para reducir la posibilidad de derrame.

Las placas deben incubarse a temperatura ambiente (20-25° C) en una cámara húmeda cerrada. Si la temperatura ambiente es superior a 25° C o inferior a 20° C deberá usarse un incubador a 22° C.

#### Lectura de los ensayos de Inmunodifusión

Un intenso rayo de luz fino proporcionará una buena iluminación. Debería ser ajustable para la variación de la intensidad y posiciones. Se deberá observar la reacción sobre un fondo negro. Una lupa puede ayudar en algunos casos. Los VIEWERS han sido diseñados para observar las reacciones de inmunodifusión coloreadas y no son adecuados para leer este tipo de ensayo.

Se necesita un mínimo de 24 horas para que la reacción de inmunodifusión se complete. Si la reacción es completa después de 24 horas de incubación, los resultados pueden informarse (de acuerdo a la ley vigente en la República Argentina, los resultados deben informarse recién a las 48 hs).

La reacción es completa cuando las líneas de los controles positivos se introducen dentro de los pocillos que contienen una muestra negativa o cuando una clara línea específica de identidad se forma entre la muestra y el suero control positivo. Algunas reacciones débilmente positivas, de las muestras; requieren 48 horas antes de que la reacción se complete. En estos casos estas muestras deben ser nuevamente repetidas antes de ser informados sus resultados. El tipo de reacción puede variar con la concentración del anticuerpo en la muestra que debe estudiarse. La línea de control positiva de referencia es la base para la lectura del test. Si no es una línea nítida el test es inválido y el ensayo debe repetirse.

#### Se observan los siguientes tipos de reacción

- 1. Negativo.** Las líneas de referencia del control positivo continúan hacia adentro del pocillo de la muestra sin doblarse o con una ligera desviación hacia fuera del pocillo del antígeno (A) y en dirección al suero control positivo (Figura 2, S1, muestra negativa)
- 2. Positivo.** La línea de control se une y forma una línea continua con la que se forma entre el suero en estudio (S2) y el antígeno (A).
- 3. Positivo débil.** La línea de control positivo se curva débilmente hacia el pocillo del antígeno (A) y más allá del pocillo del suero control de referencia, R, pero no forma una línea completa. Estas reacciones requieren una observación cuidadosa pues pueden fácilmente pasar por alto. Todas las reacciones débilmente positivas deben ser ensayadas nuevamente antes de informar los resultados.

Reacciones de inmunodifusión débiles han sido observadas en tres tipos de casos:

- Las crías recién nacidas de madres infectadas tienen reacciones débiles a bastante fuertes que pueden persistir hasta los 5 meses de edad debido a los anticuerpos del calostro. Si la madre y la cría son ambos positivos, la cría deberá ser estudiada a los 6 meses de edad para determinar si se transforma en negativo. Si la madre es negativa el positivo de la cría debe considerarse infección.
- Reacciones débilmente positivas se han observado durante el periodo de incubación de la AIE. Si se obtiene una nueva muestra entre las dos y tres semanas posteriores, la reacción debería ser más fuerte

Portadores inaparentes que no tienen síntomas de AIE por un largo periodo de tiempo pueden tener reacciones débiles cuando se estudian. En estos casos, la repetición del estudio raramente resulta en un cambio de la intensidad de la reacción.

#### 4. Muy fuerte positivo

Las líneas de referencia control positivas se doblan hacia el pocillo del antígeno antes de alcanzar el pocillo que contiene el suero en estudio (S1) y hay una línea amplia y difusa entre el suero a probar (S1) y el antígeno (A) (figura 3). Esta línea está situada muy cerca del pocillo del antígeno (A), especialmente si la placa se observa a las 24 horas.

#### 5. Líneas inespecíficas

Estas líneas se observan entre el antígeno A, y el pocillo del suero en estudio. Sin embargo la línea correspondiente al suero control de referencia pasará a través de la línea inespecífica y continuará dentro del pocillo en estudio del suero negativo (no se muestra). Las líneas inespecíficas no forman una línea continua con el suero positivo de control. Las líneas de los sueros positivos de control formarán ángulos

más agudos con una línea inespecífica que con una línea de identidad específica para EIAV. Las líneas inespecíficas se forman por anticuerpos de las muestras con otros antígenos diferentes al EIAV p26. Una muestra de suero puede producir una línea específica con el EIAV e igualmente una reacción inespecífica (Figura 3, S2). Debe tenerse mucho cuidado para asegurarse que una línea de reacción específica no esté siendo cubierta por una línea inespecífica.

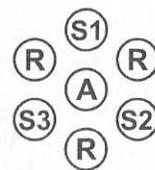


Figure 1.



Figure 2.



Figure 3.

#### 6. Halo de opacidad alrededor del pocillo

Ocasionalmente, debido a los lípidos u otros materiales en la muestra en estudio, se forma alrededor del mismo un halo de opacidad que puede ocultar la línea del control de referencia positivo cerca del pocillo de la muestra (Figura 3, S3). Si el ensayo se lee a las 24 y 48 horas, algunas veces el resultado puede ser determinado antes de que se forme el halo. Sin embargo en algunos casos la determinación no puede realizarse y debe solicitarse una nueva muestra. Todos los sueros positivos deben confirmarse antes de emitir los resultados definitivos. Igualmente las muestras que producen resultados cuestionables deben ensayarse por duplicado antes de su informe definitivo.

#### Interpretación de los resultados

Los caballos infectados con el VAIE son generalmente aceptados como portadores de por vida. Los caballos infectados pueden no mostrar los signos clínicos por meses o años pero igualmente tienen el virus de la AIE en su sangre. Por lo tanto, cualquier caballo adulto que es positivo para la técnica ID debe considerarse infectado

Nota para los usuarios de Estados Unidos de Norte América

La venta y el uso está restringido para los laboratorios aprobados por el USDA (State and Federal animal health officials). Los laboratorios del Servicio Nacional de Veterinaria periódicamente enviará muestras codificadas para evaluar la competencia de los Laboratorios aprobados por el USDA. Toda muestra con resultados dudosos debe ser enviada al Laboratorio Nacional de Veterinaria para su evaluación.

#### NOTA PARA LOS USUARIOS DE LA REPUBLICA ARGENTINA

Uso oficial por la Red de Laboratorios autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. La técnica de realización del test debe ajustarse a las reglamentaciones vigentes.

#### MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS

TELEFONO CENTRO NACIONAL DE INTOXICACIONES 0800-333-0160