

## Principio del Ensayo

El virus de la Diarrea Virica Bovina (BVDV), junto con el Virus de la Enfermedad de las fronteras (Border Disease Virus; BDV) y el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC), pertenece al género de los Pestivirus (familia *Flaviviridae*). El BVDV es capaz de atravesar la placenta y causar infección *in utero*, produciendo pérdida reproductiva ya sea por aborto, mortinato o muerte perinatal. Dependiendo del momento de la gestación en el que el feto sea infectado éste puede superar la infección dando lugar al nacimiento de un animal inmunotolerante (animales Infectados Permanentemente e Inmunotolerantes, IPI). Los IPI son sero-negativos, pero actúan como excretores de virus infectivo durante toda su vida. La denominada Enfermedad de las Mucosas acostumbra a provocar la muerte de estos animales a lo largo de los dos primeros años de vida.

El BDV causa un síndrome similar en la oveja que se reconoce más fácilmente tanto por las alteraciones en el pelaje, como por la mayor presencia de sintomatología nerviosa en muchos de los corderos infectados. También en este caso el virus puede atravesar la placenta, siendo así habituales los animales portadores que mantienen la infección en el rebaño.

El CIVTEST *bovis* BVD/BD P80 está diseñado para detectar anticuerpos frente a una proteína específica presente en todas las cepas de BVDV y BDV (proteína no estructural p80).

El CIVTEST *bovis* BVD/BD P80 se basa en un ELISA de bloqueo. Las placas están tapizadas con un antígeno inactivado de BVDV. El sistema indicador para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la p80 en las muestras es un anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa específico de la p80 (AcM-p80/HRPO). En el caso de una muestra negativa, que no contenga anticuerpos contra la p80, ningún anticuerpo de la muestra se unirá a la p80 adherida al pocillo y así, posteriormente, el AcM-p80/HRPO podrá unirse a esta. La posterior adición de un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa permitirá poner de manifiesto la presencia del AcM-p80/HRPO en el pocillo siguiendo la absorbancia a 450 nm. En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos contra la p80 presentes en la misma se unirán a la p80 adherida al pocillo, bloqueando de este modo la posterior unión del AcM-p80/HRPO, que será más tarde lavado del pocillo. Mediante este principio, el test discrimina entre la presencia (resultado positivo, sin coloración) o ausencia (resultado negativo, aparición de color amarillo) de anticuerpos anti-p80 en las muestras analizadas.

CIVTEST *bovis* BVD/BD P80 puede utilizar como muestra tanto suero como leche. En el caso de la utilización de leche el CIVTEST *bovis* BVD/BD P80 permite la interpretación de resultados tanto en leche individual como en muestra de tanque de leche. En los apartados B y C del Procedimiento del Ensayo se muestra como utilizar el suero o la leche como muestra en el ensayo. En el apartado B de Lectura de los Resultados se muestra como interpretar los resultados en función del tipo de muestra utilizada: suero individual, leche individual o tanque de leche.

## Composición del kit (suficiente para un máximo de 460 ensayos)

Producto	Cantidad
Microplacas de 96 pocillos (divididas en tiras de 8 pocillos) tapizadas con antígeno específico de BVDV.	5
Vial N°0: Solución de Lavado (10x).	2x100 ml
Vial N°1: Diluyente de Sueros: Solución diluyente de sueros con colorante verde. Lista para su uso.	60 ml
Vial N°2: Solución de Conjugado: Solución de AcM-p80/HRPO con colorante rojo. Lista para su uso.	60 ml
Vial N°3: Solución de Sustrato: Solución de TMB. Lista para su uso.	60 ml
Vial N°4: Solución de Paro: Solución de Ácido Sulfúrico. Lista para su uso.	60 ml
Vial N°5: Control Positivo Suero.	1,0 ml
Vial N°6: Control Negativo Suero.	1,0 ml
Vial N°7: Control Positivo Leche.	2,0 ml
Vial N°8: Control Negativo Leche.	2,0 ml
Cubierta adhesiva para microplaca.	5
Instrucciones de uso.	1
Certificado de análisis.	1

*El conservante empleado en los reactivos líquidos es ProClin 300.*

### Material necesario no suministrado:

Incubador (+36 °C - +38 °C), pipetas de precisión (mono o multicanal) con sus correspondientes puntas, tubos y placas de fondo en U para diluir las muestras, lector de placas de ELISA, agua destilada o desionizada y lavador de placas.

## Precauciones

Leer atentamente el manual de instrucciones. Conservar los reactivos entre +2 y +8 °C (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre +2 y +8 °C con su cubierta adhesiva y dentro de la bolsa de plástico con el saquito anti-humedad. A pesar de que el antígeno ha sido inactivado durante el proceso de fabricación, las placas tapizadas deben ser consideradas una fuente potencial de BVDV. No exponer la Solución de Sustrato a la luz intensa o a agentes oxidantes. *El TMB es muy sensible a cualquier mezcla o contaminación, por lo tanto no debe devolverse a la botella una vez sacado de ella. Se proporciona un 25% de más de este reactivo para permitir tomar un pequeño exceso cada vez que se utilice.* No utilizar los kits después de su fecha de caducidad ni mezclar los reactivos o las instrucciones de diferentes lotes de kit. Para mantener la precisión es necesario efectuar un pipeteado y unos lavados cuidadosos. No pipetear nunca los reactivos con la boca. Utilizar guantes durante todo el proceso. La Solución de Paro contiene ácido sulfúrico 2N (corrosivo), manipularla con cuidado. Descontaminar todo el material antes de su eliminación. Kit para uso veterinario. Los reactivos, sin abrir y convenientemente conservados, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior de la caja.

## Procedimiento del Ensayo

### A. Preparación de los reactivos

Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento del ensayo.

**Solución de Lavado (10x) (Vial N° 0):** Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución de Lavado (10x) a 9 volúmenes de agua destilada o desionizada (Ej. Para preparar 200 ml de Solución de Lavado diluida mezclar 20 ml de la solución concentrada (10x) con 180 ml de agua destilada o desionizada). La solución diluida puede ser almacenada hasta 3 días a temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C).

**Nota:** En su forma concentrada es posible que después de períodos prolongados de almacenamiento a 4 °C se formen cristales en la Solución de Lavado (10x). Si se pretende reconstituir todo el volumen suministrado de una sola vez, simplemente agitando por inversión el frasco varias veces será suficiente para reconstituirlo. Si sólo se reconstituye una parte del volumen (el que se vaya a utilizar para el ensayo) es preciso asegurarse de que los cristales hayan quedado totalmente redisueltos antes de preparar la dilución. Para acelerar el proceso se puede sumergir el frasco en un baño a +28 - +37 °C durante 10 - 15 min. Para evitar la aparición de cristales en la solución de lavado concentrada, ésta, una vez resuspendida, puede almacenarse a temperatura ambiente durante toda la vida del kit.

### B. Preparación de las muestras

Tanto los Controles Positivo y Negativo Suero (viales N°5 y N°6) como las muestras de suero individual deben diluirse 1/10 en Solución Diluyente de Sueros (Vial N°1).

Las muestras de leche (tanto leche individual como tanque de leche) deben ser previamente desnatadas. Un procedimiento adecuado para el desnatado puede ser centrifugar la muestra de leche a 1000 ~~g~~ 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación, aparecen 3 fases en el tubo; una superior que corresponde a la nata, una zona inferior que corresponde al suero de la leche y habitualmente aparece un precipitado blanco en el fondo del tubo (el grosor de cada una de estas fases varía mucho entre muestras). La muestra que debe recogerse para el ensayo es la correspondiente al suero que se halla por debajo de la banda de nata. Para ello se debe atravesar con la pipeta la capa de nata y recoger la muestra, evitando que ésta se contamine tanto de nata como del precipitado blanco del fondo del tubo. Debe evitarse congelar las muestras de leche antes de ser desnatadas. Si no se dispone del utillaje adecuado para el desnatado en el lugar de la toma de muestra, es preferible recoger las muestras en viales que contengan un conservante y transportarlas a +2 °C - +8 °C hasta el laboratorio. Una muestra de leche recogida en condiciones correctas y en presencia de conservante, puede mantenerse a +2 °C - +8 °C hasta 1 semana, antes de ser desnatada. Una vez desnatadas las muestras de leche pueden conservarse congeladas a -18 °C - -20 °C.

Tanto los Controles Positivo y Negativo Leche (viales N°7 y N°8) como las muestras de leche (individual o tanque), una vez desnatadas, se ensayan en el kit diluidas ½ en Solución de Lavado diluida (1x) (Vial N°0).

### C. Desarrollo del ensayo

- Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y asegurarse de que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.
- Preparar una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control. Los controles positivo y negativo deben siempre analizarse por duplicado.
  - Despegar la cubierta adhesiva de plástico y añadir:
    - Suero: Dispensar 100µl tanto de los Controles Positivo y Negativo Suero diluidos 1/10 como de las muestras diluidas 1/10 en Solución diluyente de Sueros (Vial N°1) a los pocillos apropiados en la placa.
    - Leche: Dispensar 100µl tanto de los Controles Positivo y Negativo Leche diluidos ½ como de las muestras diluidas ½ en Solución de Lavado (1x) (Vial N°0) a los pocillos apropiados en la placa.
  - Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar:
    - Suero; dos protocolos alternativos:
      - Protocolo corto: 60 minutos a +36 °C - +38 °C.
      - Protocolo largo: toda la noche (entre 15-24 horas) a +2 °C - +8 °C.
    - Leche; un solo protocolo; Toda la noche (entre 15-24 horas) a +2 °C - +8 °C.
  - Retirar el adhesivo y realizar 4 lavados de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
  - Añadir 100 µl de Solución de Conjugado (Vial N°2) a cada pocillo.
  - Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar 60 minutos a +36 °C - +38 °C.
  - Retirar el adhesivo y realizar 4 lavados de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
  - Dispensar en cada pocillo 100 µl de Solución de Sustrato (Vial N°3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
  - Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C) en la oscuridad durante 10 minutos.
  - Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo 100 µl de Solución de Paro (Vial N°4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.
  - Limpia la superficie inferior de la placa con un papel absorbente. Leer la placa utilizando un lector de ELISA equipado con un filtro de 450 nm. Realizar previamente el blanco con el aire. Registrar los resultados.

## Lectura de los Resultados

### A. Validación del Ensayo.

El test es válido si la DO<sub>450</sub> media del Control Negativo es > 0,65 y el Control Positivo presenta un %IN > 60%.

## B. Interpretación del Ensayo

Para la interpretación de los resultados es preciso transformar las DO<sub>450</sub> en Porcentajes de Inhibición (%IN) utilizando la siguiente fórmula (en ella se utiliza la media de DO<sub>450</sub> obtenida en las 2 réplicas del Control Negativo):

$$\% IN = \left[ \frac{\text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo} - \text{DO}_{450} \text{ Muestra}}{\text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

Interpretación de resultados en suero individual (protocolo corto o protocolo largo):

Valor %IN	Interpretación muestra	Estatus Animal
Inferior a 50	Negativa	Indemne o IPI
Mayor o igual a 50 e inferior a 80	Positivo Bajo	Protegido. No IPI
Superior o igual a 80	Positivo Alto	

Interpretación de resultados en leche individual (Bovina):

Valor %IN	Interpretación muestra
Inferior a 30	Negativa
Superior o igual a 30	Positiva

Interpretación de resultados en muestra de tanque de leche (Bovino):

Valor %IN	Interpretación muestra	*Prevalencia de animales Positivos (P)
Inferior a 35	Negativa	P < 10%
Mayor o igual a 35 e inferior a 60	Positiva +	10% <= P < 30%
Superior o igual a 60	Positiva ++	P >= 30%

\*Dado que volumen de leche que aporta cada vaca al tanque es variable, el valor de prevalencia a partir de la muestra de tanque debe considerarse orientativo.

### DESARROLLO DEL ENSAYO

	Suero	Leche
1	1/10 en Sol. N°1 - 100 µl/pocillo	½ en Sol. N°0(1x) - 100 µl/pocillo
2	Protocolo corto +36 °C - +38 °C 1 hora	Protocolo largo +2 °C - +8 °C 15-24 h (Noche)
3	4 veces	
4	Solución de Conjugado - 100 µl/pocillo	
5	+36 °C - +38 °C 1 hora	
6	4 veces	
7	Solución de Sustrato - 100 µl/pocillo	
8	+20 °C - +25 °C (Tª Ambiente) 10 minutos	
9	Solución de Paro - 100 µl/pocillo	
10	450 nm	

# CIVTEST BOVIS BVD/BD P80

Detección, en muestras de suero o leche, de anticuerpos específicos contra la proteína p80 del BVDV o BDV, mediante ELISA de bloqueo.