CIVTEST SUIS ADVgE

Detección de anticuerpos específicos contra la glicoproteína E (gE) del virus de la enfermedad de Aujeszky, mediante ELISA de bloqueo.

Código: 82289
Artículo:
Certificado: 12-073

IMMUNOLOGY
REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN VETERINARIA

senasa

Certificado SENASA: **12-073**
Uso profesional Exclusivo

Principio del Ensayo

En cualquier programa de control de la enfermedad de Aujeszky resulta de gran importancia la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados por cepas de campo. Muchas de las cepas vacunales utilizadas en los programas de vacunación son cepas que presentan deleciones conocidas en el gen que codifica para la glicoproteína E (gE) del Virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV). Gracias a ésta deleción los animales vacunados no producen anticuerpos contra la gE. Así, la diferenciación entre animales vacunados e infectados se basa en la presencia de anticuerpos contra la gE en los animales infectados y su ausencia en los animales vacunados con una cepa delecionada. La especificidad del CIVTEST suis ADVgE ha sido evaluada con las siguientes vacunas delecionadas: AUSKIPRA-BK (Laboratorios Hipra , S.A.) AUSKIPRA-GN (Laboratorios Hipra , S.A.), GESKALONE gE (Merial), SUVAXYN (Solvay), AUSKIMMUNE gE (SKF-Beecham), INGELVAC (Boehringer Ingelheim), NOBI-VAC AUJESZKY gE (Intervet), NOBI PORVAC (Intervet).

El CIVTEST suis ADVgE es un ELISA de bloqueo. Las placas están tapizadas con un antígeno inactivado de ADV obtenido a partir de una cepa que expresa la gE. El sistema indicador para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la gE en las muestras es un anticuerpo monoclonal (AcM) conjugado a peroxidasa (HRPO) específico de la gE. En el caso de una muestra que no contenga anticuerpos contra la gE, ningún anticuerpo de la muestra se unirá a la gE adherida al pocillo y de ésta manera el AcM añadido posteriormente al pocillo podrá interaccionar con la gE. Posteriormente, la adición de un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa permitirá poner de manifiesto la presencia del AcM en el pocillo, después del lavado, siguiendo la absorbancia del mismo a 450 nm. En el caso de una muestra procedente de un animal infectado por una cepa de campo, los anticuerpos contra la gE presentes en la misma se unirán a la gE adherida al pocillo, bloqueando de éste modo la unión posterior del AcM. El conjugado no unido a la gE será más tarde lavado del pocillo con la correspondiente no aparición de color en presencia del sustrato. Mediante éste principio, el test discrimina entre animales infectados (resultado positivo, sin coloración) y animales vacunados con vacunas delecionadas en la gE (resultado negativo,aparición de color amarillo)

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 ADV	5
VIAL Nº 0 Solución de Lavado (10x)	2x100 ml
VIAL Nº 1 Diluyente de Muestras: Solución diluyente de muestras. Lista para su uso.	30 ml
VIAL Nº 2 Solución de Conjugado: Solución de Conjugado AcM anti-ADVgE/ HRPO con colorante rojo. Lista para su uso	60 ml
VIAL Nº 3 Solución de Sustrato: Solución de TMB. Lista para su uso	60 ml
VIAL Nº 4 Solución de Paro: Solución H_2SO_4. Lista para su uso	60 ml
VIAL Nº 5 Control Positivo: Suero Control Positivo (ADVgE+)	2 ml.
VIAL Nº 6 Control Negativo: Suero Control Negativo (ADV-)	2 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 a 37ºC, 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 2º y 8ºC (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre 2º y 8ºC dentro de la bolsa de plástico con el saquito anti-humedad. A pesar de que el antígeno a sido inactivado durante el proceso de fabricación, las placas tapizadas deben ser consideradas uan fuente potencial de ADV. 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 exceso de éste 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 que es 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 Nº 0): para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución de Lavado (10x) a 9 volúmenes de **agua destilada ó desionizada** (Ej. Para preparar 200 ml de Solución de Lavado diluída mezclar 20 ml de la solución concentrada (10x) con 180 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluída puede ser almacenada hasta 3 días a + 2º C-- +4ºC.

Nota: en su forma concentrada es posible que después de períodos prolongados de almacenamiento a 4ºC 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 prepara la dilución. Para acelerar el proceso se puede sumergir el frasco en un baño a 28-37ºC durante 10-15 min. Para evitar la aparición de cristales en la Solución de Lavado Concentrada, ésta puede almacenarse a temperatura ambiente durante toda la vida del kit.

B. Preparación de las muestras

Tantos los controles (positivo y negativo) como las muestras de suero deben ser diluídas **1/2** en Diluyente de Muestras (vial Nº 1). Ésta dilución se puede realizar en la misma placa de ELISA añadiendo primero al pocillo 50 µl de Diluyente de Muestras y posteriormente 50 µl de la muestra correspondiente (ya sean controles o muestras a analizar). No utilizar la misma punta de pipeta para dispensar diferentes muestras o diferentes sueros control.

C. Procedimiento de lavado

Para asegurar la máxima reproducibilidad del ensayo se recomienda el lavado automático de la placa. Si se realiza el lavado manual cada lavado se debe realizar del siguiente modo: (a) vaciar el contenido de la placa por inversión, (b) dispensar 300 µl/pocillo de Solución de Lavado reconstituída, (c) agitar la placa vigorosamente golpeándola en el flanco, (d) vaciar el contenido de la placa por inversión. Tras el último lavado, mantener el líquido en la microplaca hasta que el siguiente reactivo esté preparado.

D. Desarrollo del ensayo

A. Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y asegurarse de que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.

B. 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.

1. **Añadir 100 µl de los controles diluídos 1/2 y 100 µl de las muestras diluídas 1/2** a los pocillos apropiados en la placa. (Como ya se ha comentado en el apartado **B. Preparación de las muestras**, ésta dilución se puede realizar en la misma placa de ELISA).

Nuevo

2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva. La incubación de la muestra se puede realizar de 2 modos:
   Protocolo corto: incubar **60 minutos a +36ºC -+ 38ºC.**
   ó
   Protocolo largo: incubar **toda la noche (entre 15-24 hs.) a +2ºC -+ 4ºC.**
3. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluída. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
4. Añadir **100 µl de Solución de Conjugado** (vial Nº 2) a cada pocillo.
5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **30 minutos a +36ºC -+38ºC**
6. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluída. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
7. Dispensar en cada pocillo **100 µl de Solución de Sustrato** (vial Nº 3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
8. Dejar desarrollar la reacción cromogénica a **temperatura ambiente (+ 20ºC -+ 25ºC)** en la oscuridad **durante 15 minutos.**
9. Dispensar en cada pocillo **100 µl de solución de paro** (vial Nº 4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.
10. Limpiar 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 diferencia entre la (DO_{450} media del Control Negativo) menos la (DO_{450} media del Control Positivo) es > 0,6 y el Control Positivo presenta un %IN > 60%.

B. Interpretación del Ensayo.

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

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

Interpretación de resultados:

Valor de %IN	Interpretación
Menor a 40,0	Muestra **Negativa**
Mayor o igual a 40,0 e inferior o igual a 45,0	Muestra **Dudosa**
Mayor de 45,0	Muestra **Positiva**

DESARROLLO DEL ENSAYO

		Protocolo corto	Protocolo largo
1		1/2 - 100 µl/pocillo	1/2 - 100 µl/pocillo
2		+36 ºC - +38 ºC/1 hora	+2 ºC - +4 ºC/Noche (15-24 horas)
3		3 veces	
4		Solución de Conjugado (100 µl/pocillo)	
5		+36 ºC - +38 ºC - 30 min.	
6		3 veces	
7		Solución de Sustrato (100 µ/pocillo)	
8		Tª Ambiente (+20 ºC -+25 ºC)/ 15 minutos	
9		Solución de Paro (100 µl/pocillo)	
10		450 nm	

Ver. ADE-08/02EÑ

MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS

TELÉFONO CENTRO NACIONAL DE INTOXICACIONES: 0800-333-0160 / (11) 4654-6648 / 7777

IMPORTADOR
Av. Rivadavia 1367 • Piso 16 • (C1033AAD)
C.A.B.A. • ARGENTINA
Tel. (011) 3221 2569 • Fax: (011) 3221 2100 Int. 2569
info@immunology.com.ar

IMMUNOLOGY
REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN VETERINARIA