

Principio del Ensayo

El CIVTEST ^{BOVIS} IBR es un test basado en un enzimoimmunoensayo (EIA) indirecto. El antígeno específico del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRV) se halla tapizando los 96 pocillos de la microplaca. Durante la incubación inicial de la muestra diluida en el pocillo, los anticuerpos específicos de IBRV se unen al antígeno adsorbido al pocillo quedando retenidos en el mismo durante el proceso de lavado. A continuación, se añade una solución de conjugado que se une a los anticuerpos bovinos retenidos en el pocillo. Posteriormente, se lava el exceso de conjugado que no haya quedado retenido y se añade un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa. La consiguiente aparición de color en cada pocillo es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos de IBRV presentes en la muestra.

CIVTEST ^{BOVIS} IBR puede utilizar como muestra tanto suero bovino como leche. En el caso de la utilización de leche el CIVTEST ^{BOVIS} IBR 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 IBRV.	5
Vial N°0: Solución de Lavado (10x).	2x100 ml
Vial N°1: Diluyente de Muestras (3x): Solución diluyente de muestras concentrada con colorante verde.	100 ml
Vial N°2: Solución de Conjugado: Solución de Anticuerpo Monoclonal frente a anticuerpos bovinos/HRPO con colorante rojo. Lista para su uso.	30 ml
Vial N°3: Solución de Sustrato: Solución de TMB. Lista para su uso.	30 ml
Vial N°4: Solución de Paro: Solución de Ácido Sulfúrico. Lista para su uso.	30 ml
Vial N°5: Control Positivo: Suero Control Positivo pre-diluido, con colorante amarillo. Listo para su uso.	2,2 ml
Vial N°6: Control Negativo: Suero Control Negativo pre-diluido, con colorante azul. Listo para su uso.	2,2 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 +36 °C - +38 °C, centrifuga, 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 °C - +8 °C (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre +2 °C - +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 IBRV. 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 es estable durante 7 días a temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C).

Diluyente de Muestras (3x) (Vial N° 1): Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución Diluyente de Muestras (3x) a 2 volúmenes de agua destilada o desionizada (Ej. Para preparar 60 ml de Solución Diluyente de Muestras diluida, mezclar 20 ml de solución concentrada (3x) con 40 ml de agua destilada o desionizada). La solución diluida es estable durante 7 días a temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C).

Nota: En su forma concentrada es posible que después de periodos prolongados de almacenamiento a +2 °C - +8 °C se formen cristales tanto en Solución de Lavado (10x) como en la Solución Diluyente de Muestras (3x). 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 °C - +37 °C 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

Los controles positivo y negativo están listos para su uso y no requieren dilución.

Las muestras de suero individual deben diluirse 1/100 en Solución Diluyente de Muestras diluida. Si se dispone de placas de serología de 96 pocillos con fondo en U y de pipeta multicanal capaz de dispensar con precisión volúmenes de 10 µl, se recomienda **realizar la dilución 1/100 en dos pasos** del siguiente modo: Diluir inicialmente, en la placa de serología, 10 µl de muestra en 190 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida y, a continuación, transferir 10 µl de esta dilución 1/20 de la muestra a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 40 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida.

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 xg, 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.

Una vez desnatadas las muestras se ensayan en el kit diluidas 1/2. 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 4 °C hasta 1 semana, antes de ser desnatada. Una vez desnatadas las muestras de leche pueden conservarse congeladas a -18 °C - -20 °C.

C. 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. Despegar la cubierta adhesiva de plástico y añadir **50 µl de controles** a los pocillos apropiados en la placa. Muestras:
 - ⇒ Suero individual: Dispensar **50 µl de las muestras diluidas 1/100** a los pocillos apropiados en la placa.
 - ⇒ Leche: Dispensar **50 µl de las muestras diluidas 1/2** a los pocillos apropiados en la placa.
 2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar:
 - ⇒ Suero individual:
 - ▶ Protocolo corto: **60 minutos a +36° C - +38 °C.**
 - ▶ Protocolo largo: **toda la noche (entre 15-24 horas) a +2 °C - +8 °C.**
 - ⇒ Leche: **toda la noche (entre 15-24 horas) a +2 °C - +8 °C.**
 3. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
 4. Añadir **50 µl de Solución de Conjugado (Vial N° 2)** a cada pocillo.
 5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +36° C - +38 °C.**
 6. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
 7. Dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Sustrato (Vial N° 3)**. Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
 8. Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar a **temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C)** en la oscuridad **durante 15 minutos.**
 9. Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Paro (Vial N° 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 DO₄₅₀ media del Control Positivo es > 0,9 y la relación $(DO_{450} \text{ media del Control Positivo} / DO_{450} \text{ media del Control Negativo})$ es > 5,0.

B. Interpretación del Ensayo

Para la interpretación de los resultados es preciso obtener el valor de IRPC (Índice Relativo x 100) de cada muestra. Para obtener el valor de IRPC de cada muestra hay que aplicar la siguiente relación (en ella se utilizan los valores medios de DO₄₅₀ obtenidos con las 2 réplicas de los controles):

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

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

Valor IRPC	Estado Inmune frente a IBRV
Menor o igual a 9,0	Negativo
Mayor de 9,0 e inferior o igual a 15,0	Sospechoso
Mayor de 15,0	Positivo

Interpretación de resultados en leche individual:

Valor IRPC	Estado Inmune frente a IBRV
Menor o igual a 0,0	Negativo
Mayor que 0,0 e inferior a 3,7	Sospechoso
Mayor o igual a 3,7	Positivo

Interpretación de resultados en muestra de tanque de leche:

Valor IRPC	Prevalencia de anticuerpos frente a IBRV en los animales que aportan al tanque*
Menor o igual a 0,0	Negativo o con prevalencia inferior al 10%
Mayor de 0,0	Positivo con prevalencia superior al 10%

*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.

CIVTEST BOVIS IBR

Detección y cuantificación de anticuerpos específicos, frente al virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina, mediante ELISA indirecto

DESARROLLO DEL ENSAYO

	Suero		Leche
	Protocolo corto	Protocolo largo	
1	1/100 - 50 µl/pocillo		1/2 - 50 µl/pocillo
2	+36 °C - +38 °C 1 hora	+2 °C - +8 °C 15-24 h (Noche)	+2 °C - +8 °C 15-24 horas (Noche)
3	3 veces		
4	Solución de Conjugado - 50 µl/pocillo		
5	+36 °C - +38 °C 1 hora		
6	3 veces		
7	Solución de Sustrato - 50 µl/pocillo		
8	+20 °C - +25 °C (Tª Ambiente) 15 minutos		
9	Solución de Paro - 50 µl/pocillo		
10	450 nm		