

Información General

Este kit de diagnóstico está diseñado para detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* en suero o plasma de bovinos, ovinos, caprinos, caninos u otras especies susceptibles.

Descripción y Principio

Los pocillos están sensibilizados con un extracto purificado de *Neospora caninum*.

Las muestras y los controles a ensayar se añaden en los micropocillos. Si hay presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* se formará un complejo antígeno-anticuerpo que enmascarará los epítomos de *N. caninum*.

Un conjugado anti-*N. caninum*-peroxidasa (HRP) se añade a los micropocillos. Este se fija a los epítomos libres restantes de *N. caninum*, lo que da lugar a la formación de un complejo antígeno-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del conjugado en exceso, el ensayo es revelado con la solución de revelación (TMB).

La coloración resultante depende de la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra a ensayar:

- En ausencia de anticuerpos, aparece una coloración azul que se convierte en amarillo después de la adición de la solución de parada
- En presencia de anticuerpos no aparece ninguna coloración.

La microplaca se lee a 450 nm.

Componentes del Kit

Reactivos*
Microplacas sensibilizadas con un extracto purificado de <i>Neospora caninum</i>
Control Positivo
Control Negativo
Conjugado concentrado (10X)
Diluyente 14
Diluyente 12
Solución de lavado concentrada (20X)
Solución de revelación (TMB)
Solución de parada (0.5 M)

* Las cantidades suministradas están indicadas en la etiqueta del kit.

1. El conjugado, los controles y la solución de revelación deben conservarse a 5°C (± 3°C).
2. Los otros reactivos pueden conservarse entre +2°C a +26°C.
3. Las soluciones de lavado, de revelación y de parada pueden ser utilizadas para toda la gama de productos de IDvet. Los diluyentes con el mismo número de lote son intercambiables.

Materiales necesarios no incluidos

1. Micropipetas o pipetas multicanales dispensadoras de volúmenes de 10 µl, 100 µl, y 300 µl.
2. Puntas de pipetas desechables.
3. Lector de microplacas de 96 pocillos.
4. Agua destilada o desionizada.
5. Lavador de placas (manual o automático).

Precauciones de uso

1. No pipetear con la boca.
2. La solución de revelación puede ser irritante para la piel.

3. La solución de parada (0.5 M) puede ser peligrosa en caso de ingestión. Puede causar sensibilización en contacto con la piel (**R22-43**). Evitar el contacto con la piel (**S24-37**).
4. No exponer la solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
5. Todos los reactivos deben ser descontaminados adecuadamente antes de ser eliminados. Eliminar los productos de acuerdo a la reglamentación en vigor.

Preparación de las muestras

Para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, es posible preparar una microplaca de 96 pocillos que contenga las muestras y los controles a ensayar, antes de transferirlos a la microplaca de ELISA utilizando una pipeta multicanal

Preparación de la solución de lavado

Si necesario, equilibrar la Solución de Lavado concentrada (**20X**) a temperatura ambiente (21°C ± 5°C) y agitarla bien hasta que la Solución Concentrada esté completamente solubilizada.

Preparar la Solución de Lavado (**1X**) diluyendo 1:20 la Solución de Lavado Concentrada (**20X**) en agua destilada/desionizada

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Asegúrese que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración). Para mayor información, sírvase contactar info@id-vet.com y solicitar la "Guía de lavado" de IDvet

Procedimiento del ensayo

Permita que todos los reactivos estén equilibrados a temperatura ambiente 21°C (± 5°C) antes de utilización. Homogenizarlos por medio de la inversión o utilizando un vortex.

Incubación corta

1. Añadir:
 - 50 µl de **Diluyente 14** a cada pocillo.
 - 50 µl de **Control Positivo** a los pocillos A1 y B1.
 - 50 µl de **Control Negativo** a los pocillos C1 y D1.
 - 50 µl de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.
2. Cubrir la placa e incubar **45 min ± 4 min** at **37°C (± 3°C)**.

Incubación nocturna

1. Añadir:
 - 90 µl de **Diluyente 14** a cada pocillo.
 - 10 µl de **Control Positivo** a los pocillos A1 y B1.
 - 10 µl de **Control Negativo** a los pocillos C1 y D1.
 - 10 µl de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.
2. Cubrir la placa e incubar **durante la noche (16 -20 horas)** a **21°C (± 5°C)**.

Para todos los procedimientos propuestos

3. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con al menos 300 µl la **Solución de lavado**. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados
4. Preparar el **Conjugado 1X** haciendo una dilución 1:10 del **Conjugado Concentrado 10X** con el **Diluyente 12**.
5. Añadir 100 µl del **Conjugado 1X** a cada pocillo.
6. Cubrir la placa e incubar **30 min ± 3 min** a 21°C (± 5°C).
7. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con al menos 300 µl de la **Solución de lavado**. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados
8. Añadir 100 µl de la **Solución de revelación** a cada pocillo.
9. Cubrir la placa e incubar **15 min ± 2 min** a 21°C (± 5°C) en la oscuridad.
10. Distribuir 100 µl de **Solución de parada** a cada pocillo, en el mismo orden que en el paso 8, para detener la reacción.
11. Leer y grabar la D.O. a 450 nm.

Validación

El ensayo es validado si:

- ✓ El valor medio de la D.O. del Control Negativo (DO_{CN}) es mayor que 0.7.

$$DO_{CN} > 0.700$$

- ✓ La razón entre el valor medio de la D.O. del Control Positivo (DO_{CP}) y el valor medio de la D.O. del Control Negativo (DO_{CN}) es menor que 0.3.

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.3$$

Interpretación

Para cada muestra, calcular el porcentaje de competición (S/N %).

$$S/N \% = \frac{DO_{muestra}}{DO_{CN}} \times 100$$

Las muestras que presentan un S/N%:

- Menor o igual que 50 % son interpretadas como positivas.
- Mayor que 50 % y menor o igual que 60% son interpretadas como dudosas.
- Mayor que 60 % son interpretadas como negativas.

Resultado	Interpretación
S/N % ≤ 50 %	POSITIVO
50% < S/N % ≤ 60%	DUDOSO
S/N % > 60%	NEGATIVO

Nota: El programa para el análisis de datos ID Soft™, se encuentra disponible gratuitamente. Para mayor información, sírvase ponerse en contacto con support.software@id-vet.com

Este programa informático permite calcular los diferentes parámetros del kit (criterios de validación, valores S/P o S/N, títulos, determinación de la edad de vacunación, grupos) y asimismo propone una síntesis gráfica de los perfiles serológicos de los animales analizados.

ID Screen® Neospora caninum Competition



ELISA de competición para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en muestras de suero o plasma de rumiantes, caninos u otras especies sensibles

Incubación corta o nocturna

Para uso *in vitro*

NCC ver 0616 ES