Principio del Ensayo

El CIVTEST AVI INFLUENZA es un test basado en un enzimoinmunoensayo (ELISA) indirecto. El antígeno, específico del Virus de la Influenza Aviar, se halla tapizando los 96 pocillos de la microplaca. Durante la incubación inicial de la muestra diluida en el pocillo, los anticuerpos específicos del Virus de la Influenza 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 de pollo 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 del Virus de la Influenza presentes en la muestra.

La Influenza Aviar (AI) es una enfermedad causada por virus de Influenza tipo A pertenecientes a la familia O*rthomyxoviridae.* Estas infecciones son motivo de gran preocupación en las zonas de producción avícola donde es endémico. Se clasifican en función de la naturaleza de su Hemaglutinina (HA) y de su Neuraminidasa (NA). Paralelamente, en función de su patogenicidad, se clasifican en virus de baja patogenicidad (LPAI) y virus de alta patogenicidad (HPAI). Una de las principales características de los virus LPAI, es que pueden, en determinadas condiciones, modificar su patogenicidad y convertirse en virus HPAI, lo que puede conllevar enormes pérdidas económicas. Este ensayo se ha desarrollado de manera que permita la detección de anticuerpos frente a las diferentes cepas víricas independientemente de su clasificación HN.

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 Virus de la Influenza.	**5**
Vial Nº0: Solución de Lavado (10x).	**2x100 ml**
Vial Nº1: Diluyente de Muestras (10x): Solución diluyente de muestras concentrada con colorante verde.	**125 ml**
Vial Nº2: Solución de Conjugado: Solución de anticuerpos anti-IgY conjugados con peroxidasa, con colorante rojo. Lista para su uso.	**30 ml**
Vial Nº3: Solución de Sustrato: Solución de ABTS. Lista para su uso.	**30 ml**
Vial Nº4: Solución de Paro: Solución de Ácido Oxálico. Lista para su uso.	**30 ml**
Vial Nº5: Control Positivo: Suero Control Positivo pre-diluido, con colorante amarillo. Listo para su uso.	**2,2 ml**
Vial Nº6: 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 una mezcla de metilisotiozolona y bromonitrodioxano.

Material necesario no suministrado:
Incubador a +37 ºC, 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 ºC (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre +2 y +8 ºC 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 Virus de la Influenza. No exponer la Solución de Sustrato a la luz intensa o a agentes oxidantes. ***El ABTS 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 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 un ácido orgánico que es tóxico y puede resultar 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 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.

Diluyente de Muestras (10x) (Vial Nº 1): Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución Diluyente de Muestras (10x) a 9 volúmenes de **agua destilada o desionizada** (Ej. Para preparar 60 ml de Solución Diluyente de Muestras diluida, mezclar 6 ml de solución concentrada (10x) con 54 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluida es estable durante 3 días a +4 ºC.

Nota: En su forma concentrada es posible que después de periodos prolongados de almacenamiento a +4 ºC se formen cristales tanto en Solución de Lavado (10x) como en la Solución Diluyente de Muestras (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 ºC 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 se presentan listos para su uso y no necesitan ser diluidos. Las muestras de suero deben ser diluidas **1/500** en diluyente de muestras reconstituido.

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 y 50 µl de las muestras diluidas 1/500** a los pocillos apropiados en la placa.
2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +37 °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 Nº2) a cada pocillo.
5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +37 °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 Nº3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
8. Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar **a +37 °C** en la oscuridad **durante 30 minutos**.
9. Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Paro** (Vial Nº4). 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 **405 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_{405} media del Control Positivo es **> 0,5** y la relación (DO_{405} media del Control Positivo / DO_{405} media del Control Negativo) es **> 4,0**.

B. Interpretación del Ensayo

Para la interpretación de los resultados se debe establecer el valor **M/P** (relación entre el valor de la muestra y el valor del control positivo). Para ello se emplea la siguiente fórmula (obtenida a partir de los valores medios de absorbancia de los controles).

$$M/P = \left[\frac{DO_{405}\text{Muestra} - \text{Media } DO_{405} \text{ Control Negativo}}{\text{Media } DO_{405} \text{ Control Positivo} - \text{Media } DO_{405} \text{ Control Negativo}} \right]$$

Cálculo del título: Log_{10} Título $= 1{,}0757 \times \text{Log}_{10}$ M/P + 3,4551 Título = Antilog (Log_{10} Título)

El CIVTEST AVI INFLUENZA es una herramienta de screening serológico de anticuerpos frente a los diferentes subtipos del virus de la influenza aviar. Asimismo, este kit también es muy adecuado para el control de la sero-conversión post-vacunal en aquellas zonas donde la vacunación frente a influenza aviar está permitida.

De este modo, se definen dos escenarios epidemiológicos de uso del kit y para cada uno de ellos se establece un sistema de interpretación de los resultados que maximiza la sensibilidad y la especificidad de la prueba:

A/ Regiones libres de influenza aviar donde el kit se utiliza como sistema de screening serológico:

Valor M/P	Título Virus de la Influenza	Interpretación
Menor o igual a 0,284	0-736	Negativo
Mayor que 0,284 y menor que 0,527	736-1432	Sospechoso
Mayor o igual que 0,527	1432 o mayor	Positivo

B/ Regiones con circulación de virus de la influenza aviar o con presencia de animales vacunados:

Valor M/P	Título Virus de la Influenza	Interpretación
Menor o igual a 0,395	0-1050	Negativo
Mayor que 0,395 y menor que 0,601	1050-1650	Sospechoso
Mayor o igual que 0,601	1650 o mayor	Positivo

DESARROLLO DEL ENSAYO

1		1/500 - 50 µl/pocillo
2		+37 ºC - 1 hora
3		3 veces
4		Solución de Conjugado (50 µl/pocillo)
5		+37 ºC - 1 hora
6		3 veces
7		Solución de Sustrato (50 µl/pocillo)
8		+37 ºC - 30 minutos
9		Solución de Paro (50 µl/pocillo)
10		405 nm

CIVTEST AVI INFLUENZA

Detección y cuantificación de anticuerpos específicos, frente a la infección por el virus de la Influenza aviar, mediante ELISA indirecto