



MONOSCREEN^{Ab} ELISA

BVDV(E0)

Prueba ELISA para el diagnóstico serológico del virus de la diarrea viral bovina

Prueba de bloqueo para sueros sanguíneos y plasmas

Prueba de diagnóstico para el ganado vacuno

Monocúpula

I- INTRODUCCIÓN

La diarrea viral bovina (DVB) y la enfermedad de las mucosas (EM) son dos entidades clínicas diferentes causadas por el mismo virus. La DVB es el resultado de una infección aguda de los animales propensos que puede producirse a cualquier edad después del parto. La mortalidad por DVB es baja, ya que la enfermedad es de corta duración. Por el contrario, la enfermedad de las mucosas es una afección con baja morbilidad, pero con una mortalidad muy elevada. La enfermedad de las mucosas se desarrolla en animales virémicos infectados *in utero*. El rasgo característico de esta infección *in utero* es la existencia de una inmunotolerancia específica que impide que los animales produzcan anticuerpos contra la cepa infectante pero no contra otra cepa antigénicamente diferente de la DVB. Los animales infectados de forma persistente con el virus pueden no desarrollar signos clínicos durante mucho tiempo y la única forma de detectarlos es mediante pruebas de laboratorio. Aunque el único método válido para detectar estos animales infectados de forma persistente sigue siendo la detección del propio virus de la DVB, se puede utilizar una prueba serológica para evitar la necesidad de analizar todos los animales de una granja para detectar el virus de la DVB en los leucocitos. De hecho, es entre los animales totalmente seronegativos donde hay más posibilidades de encontrar animales infectados de forma persistente. Sin embargo, hay que recordar que en este grupo también pueden encontrarse animales que nunca han estado en contacto con el virus. Las pruebas serológicas también permiten seguir la evolución serológica de los animales durante la vacunación e identificar los animales contaminados por el virus de la DVB mediante el seguimiento de su seroconversión.

Al ser una prueba de bloqueo, puede utilizarse en todas las especies animales.

II - PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las microplacas de 96 pocillos se recubrieron con un anticuerpo monoclonal específico de la proteína E0 del virus de la DVB. Este anticuerpo se utiliza para purificar la proteína a partir de un lisado de células infectadas con baculovirus recombinante E0. El usuario del kit coloca en los pocillos de la microplaca los sueros sanguíneos y los plasmas a analizar, previamente diluidos. Tras una incubación de 2 horas y de una fase de aclarado, añade el conjugado, un anticuerpo monoclonal específico de la proteína E0 del virus de la DVB acoplado a la peroxidasa. Después de incubar y lavar la preparación, añade la solución reveladora (TMB monocomponente). Este cromógeno tiene la doble ventaja de ser más sensible que otros cromógenos de

peroxidasa y de no ser cancerígeno. La intensidad de la tinción es inversamente proporcional al valor sérico de la muestra. Los sueros de control positivo y negativo se suministran con el kit para poder comprobar la validez de los resultados.

III - COMPOSICIÓN DEL KIT

- **Microplacas:** microplacas de 96 pocillos (12 x 8). Toda la placa de microtitulación está sensibilizada con la proteína viral E0 del VDVB.
- **Solución de lavado:** frasco de solución de lavado concentrada 20 veces. La solución cristaliza de forma espontánea en frío. En caso de uso parcial de la solución, llevar el frasco a 21 °C +/- 3 °C para que desaparezcan todos los cristales; mezclar bien la solución y tomar el volumen necesario. Diluir el tampón 20 veces en agua destilada o desmineralizada.
- **Tampón de dilución:** frasco de tampón de dilución coloreado, concentrado 5 veces.
Esta solución se utiliza para la dilución de los sueros sanguíneos, plasmas y del conjugado. Si aparece un depósito en el fondo del recipiente, filtrar la solución a través de un papel de filtro Whatman. Almacenar la solución entre +2 °C y +8 °C.
- **Conjugado:** 1 frasco de conjugado del virus de la DVB E0: (anticuerpo monoclonal anti-DVB E0 acoplado a peroxidasa de rábano).
- **Suero positivo:** frasco que contiene el suero positivo. Almacenar este reactivo entre +2 °C y +8 °C.
- **Suero negativo:** frasco que contiene el suero negativo. Almacenar este reactivo entre +2 °C y +8 °C.
- **Solución de TMB monocomponente:** frasco de cromógeno TMB (tetrametilbencidina). Este reactivo puede almacenarse entre +2°C y +8°C protegido de la luz. Está listo para usar.
- **Solución de frenado:** frasco de solución de frenado que contenga ácido fosfórico 1 M.

	BIO K 283/2	BIO K 283/5
Microplacas	2	5
Solución de lavado	1 X 100 ml (20 X)	1 X 250 ml (20 X)
Tampón de dilución (coloreado)	1 X 30 ml (5 X)	1 X 30 ml (5 X)
Conjugado	1 X 0,5 ml (50 X)	1 X 1,4 ml (50 X)
Suero positivo	1 X 0,5 ml (1 X)	2 X 0,5 ml (1 X)
Suero negativo	1 X 0,5 ml (1 X)	2 X 0,5 ml (1 X)
Solución de TMB monocomponente	1 X 25 ml (1 X)	1 X 55 ml (1 X)
Solución de frenado	1 X 15 ml (1 X)	1 X 30 ml (1 X)

IV- MATERIALES Y EQUIPOS ADICIONALES NECESARIOS

Agua destilada, probetas graduadas, vasos de precipitados, tubos de plástico, gradilla para tubos, puntas, depósito de reactivos para pipetas multicanal, tapa, adhesivo para microplacas, pipetas graduadas automáticas (monocanal y multicanal), lector de microplacas, lavador de microplacas y agitador (opcional).

V - PRECAUCIONES DE USO

- Esta prueba solo puede utilizarse para el diagnóstico *in vitro* y es para uso veterinario únicamente.
- Los reactivos deben almacenarse entre +2 °C y +8 °C. Los reactivos no pueden garantizarse si su fecha de caducidad ha pasado o si no se han almacenado en las condiciones descritas en este folleto.
- La solución de lavado concentrada y el tampón de dilución pueden conservarse a temperatura ambiente. Después de la dilución, estas soluciones tienen una estabilidad de 6 semanas si almacenadas entre +2 °C y +8 °C.
- Las tiras no utilizadas deben guardarse inmediatamente en el sobre de aluminio, asegurándose de que el desecante se mantiene seco y de que el sobre está bien cerrado. Si se siguen cuidadosamente estas precauciones, es posible conservar la actividad de las tiras hasta la fecha de caducidad del kit.
- No utilizar reactivos de otros kits.
- Es importante garantizar la calidad del agua utilizada para preparar las distintas soluciones del kit. Por ejemplo, no debe utilizarse agua que pueda contener agentes oxidantes (hipoclorito de sodio) o sales de metales pesados, ya que pueden reaccionar con el cromógeno.
- Desechar las soluciones contaminadas con bacterias u hongos.
- La solución de frenado contiene ácido fosfórico 1 M. Manipular este producto con cuidado.

- El equipo usado que ha estado en contacto con las muestras debe considerarse potencialmente infeccioso y eliminarse de acuerdo con la legislación nacional.
- Para garantizar la fiabilidad de los resultados, es importante seguir el protocolo con exactitud. Debe prestarse especial atención a que se respeten los tiempos y las temperaturas de incubación, así como a la precisión de los volúmenes y las diluciones sean precisos.

VI – PROCEDIMIENTO

- 1- Todos los componentes deben llevarse a 21 °C +/- 3 °C antes de su uso. Sacar la microplaca de su embalaje.
- 2- PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS
Los sueros sanguíneos o los plasmas deben diluirse a 1/2. Evitar el uso de muestras hemolizadas o que contengan coágulos.
Colocar 50 µl de tampón de dilución directamente en la microplaca del kit. Añadir 50 µl de cada muestra en cada pocillo. Proceder de la misma manera para los sueros de referencia (sueros positivos y negativos). Incubar durante 2 horas a 37 °C con la tapa puesta.
- 3- Aclarar la placa con la solución de lavado preparada como se describe en la sección "Composición del kit". Para ello, retirar el contenido de la microplaca invirtiéndola con fuerza sobre un recipiente que contenga un agente inactivador. Escurrir la microplaca boca abajo sobre una hoja limpia de papel absorbente para eliminar todo el líquido. Añadir 300 µl de la solución de lavado y vuelva a vaciar la placa girándola sobre el recipiente de confinamiento. Repetir toda la operación dos veces, prestando especial atención a que no se formen burbujas en los pocillos. Después de estos 3 lavados, pasar al siguiente punto.
- 4- Diluir el conjugado en el tampón de dilución a 1:50 (por ejemplo, para una placa, diluir 250 µl de la solución madre de conjugado en 12,25 ml de solución de dilución)
Añadir 100 µl del conjugado a cada pocillo utilizado. Incubar la placa a 37 °C durante media hora con la tapa puesta.
- 5- Aclarar la placa con la solución de lavado como se describe en el punto 3.
- 6- Dispensar el TMB en la microplaca a razón de 100 µl por pocillo. La solución debe ser completamente incolora. Si se observa una coloración azul, esto indica una contaminación de la solución con peroxidasa. Si esto sucede, la solución debe desecharse y se debe recolectar un nuevo TMB con un equipo perfectamente limpio.
- 7- Incubar durante 10 minutos a 21 °C +/- 3 °C en un lugar oscuro, sin cubrir. Este tiempo se da a título orientativo, ya que en algunas circunstancias puede ser útil alargarlo o acortarlo.
- 8- Dispensar la solución de frenado a razón de 50 µl por pocillo. El color cambia de azul a amarillo.
- 9- Registrar las densidades ópticas con un espectrofotómetro de placa utilizando un filtro de 450 nm. Los resultados deben registrarse lo antes posible tras la aplicación de la solución de frenado (10 min). En el caso de una señal alta, el cromógeno puede cristalizar y dar lugar a mediciones incorrectas.

VII - CÁLCULO DE RESULTADOS

Medir las densidades ópticas de los sueros positivos y negativos (DO pos y DO neg), así como las de todas las muestras (DO muestra).

Para cada muestra analizada y para el suero positivo, calcular el porcentaje de inhibición (%inh) usando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ inh muestra} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ muestra}) / DO \text{ neg}] * 100$$

$$\% \text{ inh positivo} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ pos}) / DO \text{ neg}] * 100$$

VIII - VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS

La prueba solo puede validarse si se cumplen las dos condiciones siguientes:

- DO neg - DO pos > 0,7
- % inh positivo > 50 %

IX – INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Determiner el nivel de positividad de las muestras utilizando el siguiente valores limites:

% de inhibition > o = 50 %: positif

% de inhibition < 50 %: negatif

X - PARA REALIZAR PEDIDOS

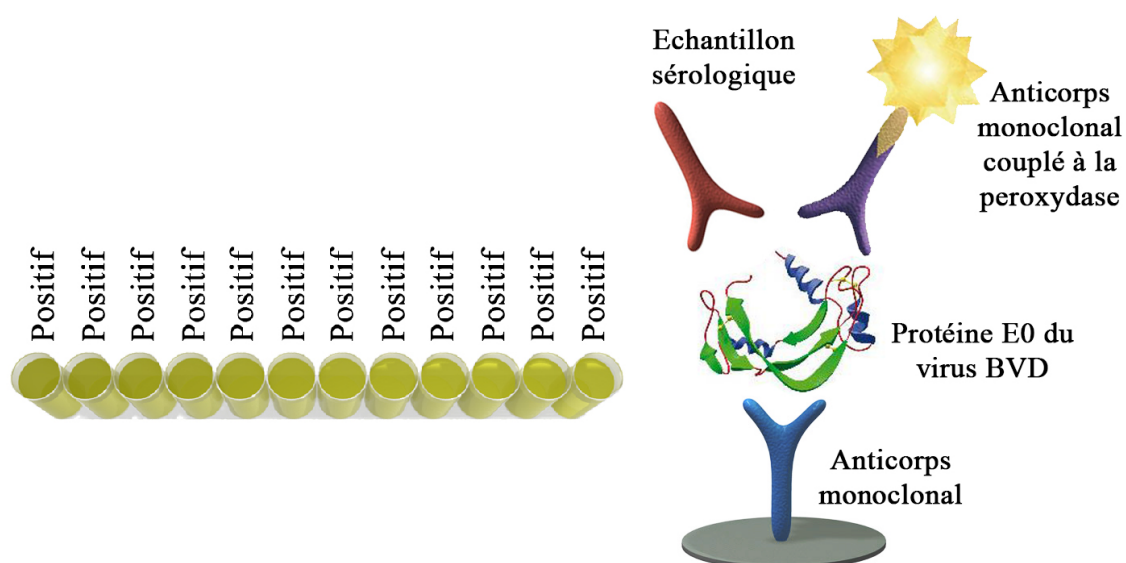
Monoscreen AbELISA BVDV (EO):

2 x 96 tests

BIO K 283/2

5 x 96 tests

BIO K 283/5



Échantillon sérologique	Muestra serológica
Anticorps monoclonal couplé à la peroxydase	Anticuerpo monoclonal acoplado a la peroxidasa
Protéine E0 du virus BVS	Proteína E0 del virus BVS
Anticorps monoclonal	Anticuerpo monoclonal
Positif	Positivo