

flocktype[®] AIV Ab

Manual de uso

Para la detección de anticuerpos del Avian
Influenza A Virus

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-B 435

REF 2 placas (n.º de catálogo FT274012)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit.....	3
Uso previsto.....	3
Símbolos	4
Control de calidad.....	4
Almacenamiento.....	5
Información de seguridad	5
Introducción.....	6
Principio.....	6
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	7
Notas importantes.....	8
Precauciones generales.....	8
Protocolo: procedimiento de prueba ELISA	9
Cuestiones importantes antes de comenzar.....	9
Antes de comenzar	9
Protocolo: ELISA.....	10
Interpretación de los datos.....	12
Criterios de validación	12
Cálculo.....	12
Interpretación de los resultados	13
Índice de cambios.....	15
Guía rápida para el flocktype AIV Ab	16

Contenido del kit

flocktype AIV Ab	(2)
N.º de catálogo	FT274012
Número de placas	2
Test Plate (placa de prueba): placa de microvaloración con 96 pocillos, recubierta de antígeno AIV no infeccioso	2
Sample Diluent (diluyente de muestras), listo para utilizar	1 × 125 ml
Negative Control (control negativo), listo para utilizar	1 × 3,5 ml
Positive Control (control positivo), listo para utilizar	1 × 3,5 ml
Wash Buffer (tampón de lavado), concentrado 10×	1 × 125 ml
Conjugate (conjugado), listo para utilizar	1 × 24 ml
TMB Substrate (sustrato TMB), listo para utilizar	1 × 24 ml
Stop Solution (solución de parada), lista para utilizar	1 × 24 ml
Manual de uso	1

Uso previsto

El flocktype AIV Ab es un ensayo ELISA específico y sensible para detectar anticuerpos del Avian Influenza A Virus en muestras de suero y plasma procedentes del pollo y el pavo.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-B 435) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual de uso



Número de catálogo



Número de material



Para muestras procedentes de pollo y pavo

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del flocktype AIV Ab se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Almacenamiento

Los componentes del kit para ensayo ELISA flocktype AIV Ab deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2-8 °C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El Wash Buffer (10x) y la Stop Solution pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25 °C) para evitar la cristalización de sales. Si el kit se suministra con tiras reactivas, almacene las que sobren en la bolsa de aluminio con cierre junto con secante a una temperatura de 2-8 °C hasta el próximo uso. Las tiras reactivas pueden almacenarse durante 6 semanas como mínimo después de abrir la bolsita de las placas.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a **compliance@indical.com**.



PRECAUCIÓN: La Stop Solution contiene ácido sulfúrico de 0,5 M.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

Introducción

El flocktype AIV Ab es una solución específica de alta sensibilidad que sirve para detectar anticuerpos del Avian Influenza A Virus (AIV) en muestras de suero y plasma procedentes de ganado aviar.

Varias cepas del Influenza A Virus son las encargadas de causar la gripe aviar. Infecta tanto a las aves salvajes como a las domésticas. Las cepas del Influenza A Virus se clasifican como de baja o alta patogenicidad. Las cepas de alta patogenicidad pertenecen a los subtipos H5 o H7 y pueden provocar los síntomas graves generalizados que se conocen como gripe aviar o peste aviar. El flocktype AIV Ab utiliza una proteína estructural del AI virus preparada mediante genotecnología como antígeno. Esta proteína presenta un elevado nivel de conservación entre las cepas del AIV, además de una gran capacidad inmunogénica. Por consiguiente, se detectarán todos los subtipos de los virus Influenza A.

Principio

La placa de prueba de microvaloración está recubierta de una proteína estructural recombinante procedente del virus. Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos específicos de AIV se unen al antígeno inmovilizado. El material sin unir se elimina mediante aclarado.

El conjugado anti-IgY acoplado a peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP) detecta los anticuerpos del suero unidos al antígeno. El conjugado sin unir se elimina mediante aclarado. Al añadir Substrate Solution, se inicia una reacción colorimétrica que se detiene trascurridos 15 minutos. Si se detecta la presencia de anticuerpos específicos de AIV en la muestra, la HRP cataliza una reacción de color azul que se vuelve amarillo después de añadir la Stop Solution.

La densidad óptica (DO) se mide utilizando un espectrofotómetro. Los valores de DO se correlacionan con la concentración de anticuerpos anti-AIV de la muestra.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Vasos de precipitados
- Cilindros de medición
- Pipetas (ajustables)
- Pipetas multicanal (ajustables)
- Aluminio o lámina adhesiva para cubrir la Test Plate
- Opcional: dispositivo para el suministro y la aspiración de Wash Buffer
- Lector de absorbancia de placa de microvaloración
- Tubos o placas para diluir las muestras
- Agua destilada

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- No exponga la TMB Substrate Solution a luz intensa o a la luz solar durante la realización de la prueba.
- Evite que los componentes del kit para la prueba se contaminen.
- No utilice los componentes del kit para la prueba si están caducados.
- El agua procedente de sistemas de intercambio iónico utilizada para diluir el Wash Buffer (10×) puede interferir con el ensayo si no es lo suficientemente pura. Utilice agua doblemente destilada o agua de alta pureza (p. ej., Milli-Q®).
- A fin de obtener resultados exactos de la prueba, es imprescindible utilizar material de cristal limpio y pipetear y aclarar con atención, así como respetar de forma estricta los tiempos de incubación indicados durante la prueba.

Protocolo: procedimiento de prueba ELISA

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 8 antes de comenzar.

Antes de comenzar

- Permita que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (18-25 °C) inmediatamente antes de utilizarlos. Si se han precipitado cristales de sal en el Wash Buffer (10×), disuélvalos agitando suavemente y aplicando calor.
- Diluya el Wash Buffer (10×) con agua destilada en una proporción de 1:10. Por ejemplo, para una sola Test Plate, diluya 25 ml de Wash Buffer (10×) en 225 ml de agua destilada y mezcle.
- Muestras de suero/plasma: antes de proceder a su análisis, diluya las muestras de suero/plasma con Sample Diluent en una proporción de 1:500 (p. ej., diluya 1 µl de muestra en 499 µl de Sample Diluent) y mezcle bien. Utilice tubos de plástico o placas de microvaloración sin recubrimiento para la dilución. Cambie las puntas de las pipetas para cada muestra.

También es posible diluir muestras de suero/plasma a partir de una predilución (1:50 en Sample Diluent) directamente en la Test Plate (consulte el paso 1a del procedimiento).

- Los controles se suministran listos para utilizar y no requieren de una dilución.

Protocolo: ELISA

Consulte “Antes de comenzar” en la página 9.

Procedimiento

1. Pipetee 100 μ l de cada uno de los controles listos para utilizar, Negative Control y Positive Control (por duplicado), y las muestras diluidas en una proporción 1:500, en los pocillos de la Test Plate.
- 1a. También puede pipetear 90 μ l de Sample Diluent en cada pocillo de muestras y añadir 10 μ l de la muestra prediluida en una proporción 1:50. Mezcle bien.

Nota: Registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la transferencia de muestras. Cubra la Test Plate.

2. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
3. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
4. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
5. Pipetee 100 μ l de Conjugate listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
6. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
8. Pipetee 100 μ l de TMB Substrate Solution en cada pocillo.

9. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
10. Detenga la reacción añadiendo 100 μ l de Stop Solution a cada pocillo. Añada la Stop Solution en el mismo orden en que se añadió la Substrate Solution.
11. Mida la DO en el lector de placas a 450 nm en un periodo de 20 minutos tras la parada de la reacción.

La medición a una longitud de onda de referencia (620-650 nm) es opcional.

Interpretación de los datos

Criterios de validación

Los resultados serán válidos si se cumplen los criterios siguientes:

- El valor medio (VM) de la DO medida para el Positive Control (PC) debe ser $\geq 0,7$.
- El valor medio (VM) de la DO medida para el Negative Control (NC) debe ser $\leq 0,2$.

En el caso de obtener ensayos no válidos, repita la prueba después de leer detenidamente las instrucciones de uso.

Cálculo

Calcule el VM de la DO medida para el Negative Control (NC) y el Positive Control (PC).

El cociente (M/P) de la DO de la muestra con respecto a la DO media del Positive Control se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$M/P = \frac{DO_{\text{muestra}} - VM_{DO_{NC}}}{VM_{DO_{PC}} - VM_{DO_{NC}}}$$

Los títulos del criterio de valoración se calculan a partir del cociente M/P diluido a una concentración de 1:500 utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_{10} \text{ Título} = 1,54 (\text{Log}_{10} M/P) + 3,77$$

Interpretación de los resultados

- Las muestras con el cociente M/P $<0,3$ se consideran negativas. No se han podido detectar anticuerpos específicos de AIV.
- Las muestras con el cociente M/P $\geq 0,3$ se consideran positivas. Se han detectado anticuerpos específicos de AIV.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite **www.indical.com** para obtener más información sobre los productos afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

Acuerdo de licencia limitada para el flocktype AIV Ab

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.indical.com.

Marcas comerciales: afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, FlockSoft™, flocktype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-1589-EN-004 © 2018-2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-1589-EN-004	Diciembre 2022	Cambios editoriales
HB-1589-EN-003	Junio 2022	Cambio del tiempo de incubación de TMB a 15 min
HB-1589-002	Mayo 2018	Diseño de INDICAL

Guía rápida para el flocktype AIV Ab

Dilución de la muestra:

Suero, plasma 1:500, mezclar bien

Paso	Protocolo
1. Muestra	100 µl/pocillo
2. Incubación	30 min a temp. ambiente
3. Lavado	3 × 300 µl
4. Conjugado	100 µl/pocillo
5. Incubación	30 min a temp. ambiente
6. Lavado	3 × 300 µl
7. TMB	100 µl/pocillo
8. Incubación	15 min a temp. ambiente
9. Parada	100 µl/pocillo
10. Lectura	450 nm

Interpretación de los datos

	Negativa	Positiva
Suero, plasma	M/P <0,3	M/P ≥0,3