

Marzo de 2017

Manual de uso del kit *cattletype*[®] BHV1 gE Ab



5 (n.º de
referencia 270203)



20 (n.º de
referencia 270205)

Para la detección de anticuerpos de
glicoproteína E de herpesvirus bovino 1

Registrado conforme al artículo 17c de la ley alemana sobre
enfermedades de animales (Flu-B 664)

REF

270203; 270205



QIAGEN Leipzig GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit.....	3
Uso previsto	4
Símbolos.....	5
Almacenamiento	6
Información de seguridad	6
Control de calidad	7
Introducción	8
Principio	9
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	10
Notas importantes.....	11
Precauciones generales	11
Protocolo: procedimiento de prueba ELISA.....	12
Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma	13
Procedimiento de prueba para muestras de leche	15
Interpretación de los datos	16
Guía de resolución de problemas	19
Apéndice: guía rápida	20
Información para pedidos	21

Contenido del kit

<i>cattletype</i> BHV1 gE Ab	(5)	(20)
Referencia	270203	270205
Número de placas	5	20
Test Plate (placa de prueba): placa de microtítulo con 96 pocillos, recubierta de antígeno de BHV1 inactivado	5	20
Sample Diluent (diluyente de muestras), listo para utilizar	1 x 30 ml	1 x 125 ml
Negative Control (control negativo), listo para utilizar	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Positive Control (control positivo), listo para utilizar	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Wash Buffer (tampón de lavado), (10x)	3 x 125 ml	2 x 500 ml
Conjugate (conjugado), listo para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
TMB Substrate (sustrato TMB), listo para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Stop Solution (solución de parada), lista para utilizar	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Manual de uso	1	1

Uso previsto

La prueba *cattletype* BHV1 gE Ab es un inmunoensayo enzimático (ELISA) diseñado para la detección de anticuerpos de glicoproteína E de herpesvirus bovino 1 (BHV1) en muestras de suero, plasma y leche procedentes de ganado bovino infectado con BHV1. Este kit está certificado por el Friedrich-Loeffler-Institute y registrado conforme al artículo 17c de la ley alemana sobre enfermedades de animales (FLI-B 664) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos



Contiene reactivos para <N> placas



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual de uso



Número de referencia



Número de material



Para muestras de ganado bovino

Almacenamiento

Los componentes del kit ELISA *cattletype* BHV1 gE Ab deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El tampón de lavado (10x), el diluyente de muestras y la solución de parada pueden almacenarse a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) para evitar la cristalización de sales. Si el kit se suministra con tiras reactivas, almacene las tiras reactivas sobrantes en la bolsa de aluminio con cierre junto con desecante a una temperatura comprendida entre 2 °C y 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

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.



PRECAUCIÓN: la solución de parada contiene 0,5 M de ácido sulfúrico.

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

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *cattletype* BHV1 gE Ab se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Introducción

cattletype BHV1 gE Ab es un ensayo sensible para la detección de anticuerpos de glicoproteína E (gE) de herpesvirus bovino 1 (BHV1) en muestras de suero, plasma y leche. El BHV1 es el agente causal de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR), una enfermedad de las vías respiratorias que provoca traqueitis, rinitis y fiebre. Además, la infección por BHV1 puede ocasionar vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis y abortos.

Tras la enfermedad clínica, el BHV1 suele producir una infección latente. La reactivación del virus puede causar la propagación de la infección en el rebaño.

Los métodos serológicos convencionales no distinguen entre animales infectados de forma natural y animales vacunados, con la excepción de las vacunas contra la IBR, las cuales carecen de proteína viral gE y, por lo tanto, posibilitan la diferenciación serológica. El ensayo *cattletype* BHV1 gE Ab detecta específicamente los anticuerpos de gE y no reacciona con anticuerpos procedentes de vacunas con supresión de gE. Por lo tanto, este método identifica si los animales han sido infectados con cepas de campo de BHV1 o inoculados con vacunas contra la IBR en las que no se ha suprimido la gE.

Principio

El ensayo *cattletype* BHV1 gE Ab es un ensayo ELISA de bloqueo. La placa de prueba está recubierta de antígeno de BHV1 inactivado. Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos específicos del BHV1 se unen al antígeno inmovilizado. El material sin unir se elimina mediante aclarado. A continuación se añade el anticuerpo monoclonal específico para gE conjugado con HRP, que no puede unirse al antígeno BHV1 mientras su determinante antigénico esté bloqueado por anticuerpos de la muestra de la prueba. El conjugado anti-gE-HRP sin unir se retira mediante aclarado. Al añadir solución de sustrato se inicia una reacción colorimétrica que se detiene trascurridos 10 minutos. La densidad óptica (DO) se mide mediante un espectrofotómetro. El valor de bloqueo (porcentaje de inhibición) se calcula a partir de los valores de DO obtenidos con la muestra de prueba y el control negativo, el cual no contiene anticuerpos específicos de gE de BHV1.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Vaso de precipitados
- Cilindros de medición
- Pipetas (ajustables)
- Pipetas multicanal (ajustables)
- Aluminio o lámina adhesiva para cubrir la placa de prueba
- Opcional: dispositivo para el suministro y la aspiración de tampón de lavado
- Lector de absorbancia de placa de microtítulo
- 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 solución de sustrato TMB a luz intensa o a la luz solar durante la realización de la prueba.
- Evite que los componentes del kit de prueba se contaminen o mezclen con los componentes de otros lotes.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- El agua procedente de sistemas de intercambio iónico utilizada para diluir el tampón de lavado (10x) 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 11 antes de comenzar.

Antes de comenzar

- Permita que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (18-25 °C) inmediatamente antes de su uso. Si se han precipitado cristales de sal en el tampón de lavado (10x), disuélvalos agitando suavemente y aplicando calor.
- Diluya el tampón de lavado (10x) con agua destilada en una proporción de 1:10. Por ejemplo, para una placa de prueba, diluya 50 ml de tampón de lavado (10x) en 450 ml de agua destilada y mezcle.
- Muestras de suero/plasma: pueden utilizarse muestras de suero o plasma recién obtenidas, refrigeradas o congeladas previamente.

Preparación de muestras de leche

Antes de proceder a su análisis, las muestras de leche se deben desgrasar. Centrifugue las muestras de leche entera durante 10 minutos a 3.000 × g a una temperatura de 10 °C o almacene las muestras a 2-8 °C durante toda la noche. A continuación, retire la crema de la leche.

Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma
Consulte el apartado “Antes de comenzar” en la página 12.

Procedimiento

1. Pipetee 50 µl de diluyente de muestras listo para utilizar en los pocillos de la placa de prueba.
2. Pipetee 50 µl de control negativo (por duplicado) y control positivo (por duplicado) en los pocillos correspondientes y mezcle.
3. Pipetee 50 µl de las muestras en el resto de los pocillos y mezcle.

Nota: registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. El procedimiento de mezcla puede realizarse con un agitador de placas o aspirando y dispensando el líquido varias veces. Cubra la placa de prueba.

4. Incube durante toda la noche (16-22 h) a temperatura ambiente (18 °C-25 °C).
5. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
6. Aclare cada pocillo 5 veces con 300 µl de tampón de lavado preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Pipetee 100 µl de conjugado listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C).

8. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
9. Aclare cada pocillo 5 veces con 300 μ l de tampón de lavado preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
10. Pipetee 100 μ l de solución de sustrato TMB en cada pocillo.
11. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
12. Detenga la reacción añadiendo 100 μ l de solución a cada pocillo. Añada la solución de parada en el mismo orden en que se añadió la solución de sustrato.
13. 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.

Procedimiento de prueba para muestras de leche

Consulte el apartado "Antes de comenzar" en la página 12.

Procedimiento

1. Pipetee 100 μ l de control negativo (por duplicado) y control positivo (por duplicado) en los pocillos correspondientes.
2. Pipetee 100 μ l de las muestras de leche desgrasadas en el resto de los pocillos.

Nota: registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Cubra la placa de prueba.

3. Incube durante toda la noche (16-22 h) a temperatura ambiente (18 °C-25 °C).
4. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
5. Aclare cada pocillo 5 veces con 300 μ l de tampón de lavado preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
6. Pipetee 100 μ l de conjugado listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C).
7. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
8. Aclare cada pocillo 5 veces con 300 μ l de tampón de lavado preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
9. Pipetee 100 μ l de solución de sustrato TMB en cada pocillo.

10. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
11. Detenga la reacción añadiendo 100 μ l de solución a cada pocillo. Añada la solución de parada en el mismo orden en que se añadió la solución de sustrato.
12. 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 control negativo (CN) es $\geq 0,5$.
- El valor de bloqueo calculado a partir del VM del valor de la DO medida para el control positivo (CP) es $\geq 75\%$.

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 control negativo (CN) y el control positivo (CP).

Cálculo para muestras de suero y plasma

El valor de bloqueo se calcula con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de bloqueo} = \frac{\text{VM DO}_{\text{CN}} - \text{DO}_{\text{muestra}}}{\text{VM DO}_{\text{CN}}} \times 100$$

Cálculo para muestras de leche

El valor de bloqueo se calcula con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de bloqueo} = \frac{(\text{VM DO}_{\text{CN}} * 2) - \text{DO}_{\text{muestra}}}{(\text{VM DO}_{\text{CN}} * 2)} \times 100$$

Interpretación de los resultados

Interpretación de los datos para las muestras de suero y plasma

- **Las muestras con valores de bloqueo < 40% son negativas.**
No se han podido detectar anticuerpos específicos de gE de BHV1.
- **Las muestras con valores de bloqueo $\geq 40\%$ y < 50% son sospechosas.**
Se recomienda volver a analizar las muestras de los animales con resultados sospechosos.
- **Las muestras con valores de bloqueo $\geq 50\%$ son positivas.**
Se han detectado anticuerpos específicos de gE de BHV1.

Interpretación de los datos para las muestras de leche

- **Las muestras con valores de bloqueo < 35% son negativas.**
No se han podido detectar anticuerpos específicos de gE de BHV1.
- **Las muestras con valores de bloqueo $\geq 35\%$ son positivas.**
Se han detectado anticuerpos específicos de gE de BHV1.

Nota: si se obtienen resultados negativos para muestras de leche individuales, se recomienda volver a analizar las muestras de suero o plasma de esos animales para comprobar su estado de BHV1 individual. Al analizar muestras agrupadas o globales de leche, se puede incrementar la sensibilidad utilizando protocolos adecuados para la concentración de la inmunoglobulina de la leche.

Guía de resolución de problemas

Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en **www.qiagen.com**).

Apéndice: guía rápida

Dilución de la muestra:

Suero/Plasma 1:2, mezclar bien

Leche sin diluir

Paso	Protocolo
1. Muestra	100 µl/pocillo
2. Incubación	Durante la noche (16-22 h) a temp. ambiente
3. Lavado	5 × 300 µl
4. Conjugado	100 µl/pocillo
5. Incubación	30 min a temp. ambiente
6. Lavado	5 × 300 µl
7. TMB	100 µl/pocillo
8. Incubación	10 min a temp. ambiente
9. Parada	100 µl/pocillo
10. Lectura	450 nm

Interpretación de los datos

	Negativa	Sospechosa	Positiva
Suero/Plasma	< 40%	≥ 40% y < 50%	≥ 50%
Leche	< 35%	–	≥ 35%

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>cattletype</i> BHV1 gE Ab (5)	Para 480 reacciones: 5 placas de prueba (tiras), tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270203
<i>cattletype</i> BHV1 gE Ab (20)	Para 1.920 reacciones: 20 placas de prueba, tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270205
Productos relacionados		
<i>cattletype</i> BHV1 gB Ab (5)	Para 480 reacciones: 5 placas de prueba (tiras), tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270043
<i>cattletype</i> BHV1 gB Ab (20)	Para 1.920 reacciones: 20 placas de prueba, tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270045
<i>cattletype</i> MAP Ab (5)	Para 480 reacciones: 5 placas de prueba (tiras), tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270803

Producto	Contenido	Referencia
<i>cattletype</i> MAP Ab (20)	Para 1.920 reacciones: 20 placas de prueba, tampón de lavado, diluyente de muestras, control positivo, control negativo, conjugado, solución de sustrato TMB, solución de parada	270805
<i>cattletype</i> Milk Prep Kit (50)	Reactivo de precipitación, tampón de neutralización, matriz, tampón de elución, filtros de centrifugado, tubos de recogida	271906

QIAGEN ofrece una amplia gama de kits ELISA así como kits PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales. Visite www.qiagen.com/animal-health para obtener más información sobre los productos *bactotype*[®], *cador*[®], *cattletype*, *flocktype*[®], *pigtype*[®] y *virotype*[®].

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Acuerdo de licencia limitada para *cattletype* BHV1 gE 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. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su(s) uso(s) 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. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN 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 costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual con relación a este kit y con sus componentes.

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

Marcas comerciales: QIAGEN®, *Sample to Insight*®, *bactotype*®, *cador*®, *cattletype*®, *flocktype*®, *pigtype*®, *virotype*® (Grupo QIAGEN); 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-1833-005 © 2014-17 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Australia • techservice-au@qiagen.com
Austria • techservice-at@qiagen.com
Belgium • techservice-bnl@qiagen.com
Brazil • suportetecnico.brasil@qiagen.com
China • techservice-cn@qiagen.com
Denmark • techservice-nordic@qiagen.com
Finland • techservice-nordic@qiagen.com
France • techservice-fr@qiagen.com
Germany • techservice-de@qiagen.com
Hong Kong • techservice-hk@qiagen.com
India • techservice-india@qiagen.com
Ireland • techservice-uk@qiagen.com
Italy • techservice-it@qiagen.com
Japan • techservice-jp@qiagen.com
Korea (South) • techservice-kr@qiagen.com
Luxembourg • techservice-bnl@qiagen.com
Mexico • techservice-mx@qiagen.com
The Netherlands • techservice-bnl@qiagen.com
Norway • techservice-nordic@qiagen.com
Singapore • techservice-sg@qiagen.com
Sweden • techservice-nordic@qiagen.com
Switzerland • techservice-ch@qiagen.com
UK • techservice-uk@qiagen.com

www.qiagen.com