

MegaELISA® FeLV Antigen ad us. vet.

Immunoensayo enzimático (ELISA) para la detección cualitativa de los antígenos del virus de la leucemia felina (FeLV) en el plasma o suero del gato

Diagnóstico *in vitro*

INSTRUCCIONES DE USO

Art. No. 950096EG1 (96's)
950048EG1 (48's)

Fabricante:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📠 (+43) 5573 85400-4
✉ info@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® FeLV Antigen ad us. vet.

Tabla de contenido

Página

1. Introducción	3
2. Indicación de uso	3
3. Principio de la prueba	3
4. Componentes del kit de análisis	4
5. Estabilidad y almacenaje	5
6. Información sobre la muestra	5
7. Preparación de la prueba	6
8. Procedimiento	7
9. Evaluación de la prueba	8
10. Precauciones y advertencias	9
11. Responsabilidad	10
12. Instrucción de uso abreviada	11
Abreviaturas	2

Abreviaturas

- FeLV Virus de la leucemia felina
- H₂O₂ Agua oxigenada
- PRP Peroxidasa de rábano picante
- TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la leucemia felina (FeLV) es un virus de ARN oncogénico transmisible que causa enfermedades neoplásicas y no neoplásicas en gatos en todo el mundo.

La transmisión del FeLV se produce principalmente mediante secreciones (p.ej., saliva), excreciones (p.ej., heces y orina) así como intrauterinamente por transfusión sanguínea y vía calostro. Como que el FeLV solo sobrevive algunos minutos en el exterior, solo se puede dar una transmisión efectiva durante contacto estrecho con gatos infectados.

El curso de una infección por FeLV depende fundamentalmente del estado inmunológico y la edad del animal infectado, así como de la dosis de infección y la virulencia del virus. Las manifestaciones clínicas causadas directamente por la infección por FeLV incluyen, entre otras, Linfosarcoma, leucemia mieloide, atrofia del timo, anemia aplásica y un síndrome de enfermedad similar a la panleucopenia.

Debido al efecto inmunosupresor del FeLV, los gatos infectados son más susceptibles a diversas enfermedades secundarias. Los gatos virémicos infectados con FeLV generalmente muestran altas concentraciones de antígeno p27 extracelular (libre) desde tan solo 3 semanas después de la infección. Esta detección del antígeno p27 se considera el diagnóstico de rutina de elección para detectar la infección por FeLV.

Basado en anticuerpos monoclonales altamente específicos contra el antígeno p27, el **MegaELISA® FeLV Antigen** es un componente de diagnóstico importante para aclarar casos clínicos sospechosos (separación de portadores del virus) o para verificar el estado del FeLV antes de la vacunación.

Ni los anticuerpos maternos ni la vacunación con FeLV influyen en el resultado de la prueba del MegaELISA® FeLV Antigen.

2. INDICACIÓN DE USO

El **MegaELISA® FeLV Antigen** es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de los antígenos del virus de la leucemia felina (FeLV) en el plasma o suero del gato.

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El **MegaELISA® FeLV Antigen** se basa en la detección de inmunoensayo cualitativo de los antígenos del virus de la leucemia felina (FeLV) en el principio sándwich.

Los anticuerpos monoclonales contra el antígeno p27 se unen a la superficie de los pocillos de la placa de la microtitulación. Las muestras de plasma o suero a examinar o los controles se pipeteen en los pocillos de la placa de microtitulación para su incubación a temperatura ambiente (20–25°C). Después de un paso de lavado, se agrega el conjugado anti-p27 marcado con peroxidasa de rábano picante (PRP) y se incuba a temperatura ambiente (20–25°C). El conjugado no unido se elimina mediante lavado. Tras la adición del sustrato (tetrametilbencidina, TMB), para muestras positivas, la

encima unida convierte la solución incolora en los pocillos de la placa de microtitulación en una solución azul.

Agregar un reactivo de parada (ácido sulfúrico) hace que el color cambie de azul a amarillo. La extinción de la solución amarilla en la placa de microtitulación es proporcional a la concentración de antígenos de FeLV en la muestra.

4. COMPONENTES DEL KIT DE ANÁLISIS

4.1. COMPONENTES SUMINISTRADOS EN EL KIT DE ANÁLISIS

Los reactivos contenidos en el kit de análisis son suficientes para 48 o 96 determinaciones.

Contenido	Kit 48's	Kit 96's
1. Placa de microtitulación con tiras separables con 8 pocillos cada uno, en el bastidor de soporté, recubiertos con anticuerpos monoclonales contra p27	6 tiras separables	12 tiras separables
2. Tampón de lavado (10× tampón de TRIS, pH 7,2 ± 0,2, contiene 0,045 % ProClin® 300), tapa blanca	25 ml	50 ml
3. Control Positivo (contiene 0,045 % ProClin® 300), listo para su uso, tapa roja	0,5 ml	1 ml
4. Control Negativo (contiene 0,045 % ProClin® 300), listo para su uso, tapa azul	0,5 ml	1 ml
5. Conjugado (anticuerpos anti-p27, marcados con peroxidasa de rábano, contiene 0,045 % ProClin® 300), listo para su uso, tapa blanca	6 ml	12 ml
6. Sustrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina [TMB]/H ₂ O ₂), listo para su uso, tapa amarilla. No exponer a la luz directa del sol.	6 ml	12 ml
7. Solución de parada (0,2 M ácido sulfurico), listo para su uso, tapa roja	8 ml	15 ml
8. Papel de plástico para cubrir	1	1
9. Hoja de evaluación	1	1
10. Instrucciones de uso	1	1

4.2. COMPONENTES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada
- Vortex-Mixer/Mezclador vortex
- Papel de filtro/toallitos de laboratorio
- Cilindro de medición (1000 ml)
- Cronógrafo

- Lavadora para los pocillos de la placa de microtitulación o pipeta multicanal (300 µl)
- Fotómetro para los pocillos de la placa de microtitulación (450 nm, filtro de referencia 620 nm)
- Papelero con una solución 0,5 % de hipoclorito

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE



Almacenamiento
2–8 °C



Usar antes de
– ver etiqueta



Para el uso veterinario



Número de lote



Diagnóstico *in vitro*



No utilizar reactivos de
otros kits de análisis,
número de lote o pasada
la fecha de caducidad



Seguir las instrucciones
de uso detenidamente

Se debe evitar contaminación microbiana. Después de la fecha de caducidad no hay garantía de calidad, se puede dar más.

Al abrir la bolsa de aluminio sellada de la placa de microtitulación, asegúrese de que el sello de clip resellable no esté dañado o cortado. Retirar el número necesario de tiras de microtitulación, añadir el resto de inmediato en la bolsa, sellar y almacenar a 2–8 °C. Debe evitarse un efecto directo de la luz sobre el sustrato ligeramente azul claro, debe evitarse para prevenir la descomposición o coloración azul por autooxidación. Si el exterior se convierte en coloración azul, el sustrato ya no podrá ser utilizado.

6. INFORMACIÓN SOBRE LA MUESTRA

- Solamente plasma o suero de origen felino podrá ser utilizado como material de muestra.
- Homogeneizar la muestra adecuadamente antes de su uso.
- Si las muestras a analizar no han mantenido refrigeradas (**20–25 °C**), se deberían analizar en un plazo de 4 horas. Conservadas a **2–8 °C**, el plasma o suero se puede analizar hasta un plazo máximo de 5 días. Las muestras plasma o suero se pueden dividir en alícuotas y conservar permanentemente a una temperatura de **–20 °C**. Evite la congelación y descongelación repetida.

- Algunas muestras lipémicas o hemolíticas pueden causar una coloración de fondo. Si este es el caso, se recomienda que la prueba se realice con muestras de mayor calidad.
- Tenga en cuenta, que tanto las muestras como todos los componentes del kit de análisis, deberían estar a temperatura ambiente en el momento de su utilización.
- **ATENCIÓN:** Tubos con EDTA, citrato o heparina parcialmente llenos o insuficientemente homogeneizados, puede causar efectos de interferencia que pueden conducir a diferentes resultados de las pruebas.

7. PREPARACIÓN PARA LA PRUEBA

 **Seguir las instrucciones de uso detenidamente. Para la fiabilidad de los resultados, es necesario seguir las instrucciones de uso exactamente. Realice todas las etapas del ensayo en el orden indicado y sin demora. Para cada paso de pipeteado se recomienda utilizar materiales desechables.**

7.1. GENERAL

- Las tiras de microtitulación solo deben retirarse del envase después de que se haya alcanzado la temperatura ambiente. Para evitar pérdidas por evaporación es aconsejable cubrir o enmascarar las tiras.
- Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de su uso.
- Después de su uso tanto en las tiras de microtitulación no utilizadas (en bolsas de aluminio selladas) así como los reactivos no utilizados deben almacenarse a 2–8°C.
- Las tiras de microtitulación una vez utilizadas, no deben ser reutilizadas.
- Todos los componentes del kit de análisis dañados no podrán ser utilizados.
- Un contacto directo de las muestras con los componentes del kit de análisis debe ser evitado (contaminación cruzada).
- Evite la luz solar directa durante la ejecución de la prueba.

7.2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO 1:10

Una parte de tampón de lavado concentrado (50 ml) se mezclan con 9 partes de agua destilada (450 ml). Si se puede observar los cristales de concentrado de tampón de lavado, disolverlos calentando, el tampón de lavado se introduce en un baño de agua a 37°C. El tampón así diluido se puede almacenar a temperatura ambiente (20–25°C) durante 5 días.

7.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS / DE LOS CONTROLES

- Las muestras se utilizan sin diluir.
- **ATENCIÓN:** Al usar un lavador para ELISA, las muestras deben estar libres de partículas. Para asegurar esto, introduzca las muestras en la centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Los controles están listos para usar y no deben diluirse.

8. PROCEDIMIENTO

- Homogeneizar el material de las muestras bien antes de usar.
- Antes de comenzar la prueba, use la hoja de evaluación provista para determinar la posición correcta de las muestras de pacientes y los estándares/controles en las tiras de microtitulación. Se recomiendan determinaciones al menos por duplicado.
- Utilice puntas desechables limpias para cada paso de pipeteo.

8.1. APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y PRIMERA INCUBACIÓN

- Introducir el número necesario de tiras de microtitulación en el bastidor soporté.
- Introduzca en cada pocillo
 - 50 µl Control Positivo (2×)
 - 50 µl Control Negativo (2×)
 - 50 µl de las muestras (2×) sin dilución!

en el orden que van a ser analizadas y en el respectivo pocillo de la tira de microtitulación. **Deje un pocillo para el blanco del sustrato.**

- Agitar la placa de microtitulación ligeramente, cubrir la placa e incubar por **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C)**.

8.2. LAVADO – CUIDADOSO y Estrictamente y de acuerdo a las instrucciones

LAVADO A MANO

- Deseche el incubado a través de desembocar en un contenedor de desechos con hipoclorito. Elimine de acuerdo con las regulaciones locales.
- Noquear varias veces sobre un papel de laboratorio/paño absorbente la placa de microtitulación.
- Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado por pocillo.
- **Debiente estar completamente vacío entre cada ciclo de lavador y luego golpear con cuidado varias veces en un lugar seco y sin uso.**

LAVADO CON LAVADOR PARA ELISA

- **ATENCIÓN:** Las muestras con partículas se debe quitar manualmente antes de la primera etapa de lavado (posible obstrucción de las agujas de lavado).
- El ajuste correcto del lavador de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Para obtener resultados óptimos de lavado de al menos 300 µl de tampón de lavado por pocillo y paso de lavado.
- Aspiración completa del líquido después de cada etapa de lavado.
- Después de la última etapa de lavado intenso de la placa, utilizar un papel secante de laboratorio/tela para noquear enérgicamente. No debe haber humedad residual que permanezca en los pocillos.

8.3. SEGUNDA INCUBACIÓN

- Introduzca **100 µl de Conjugado** en cada pocillo de la placa de microtitulación excepto la determinación del blanco de sustrato.
- Agitar la placa de microtitulación ligeramente, cubrir la placa e incubar por **10 minutos a temperatura ambiente (20–25°C) y en la oscuridad**.
- Lave como se describió anteriormente.

8.4. TERCERA INCUBACIÓN

- Introduzca **100 µl de Sustrato (TMB)** en cada pocillo.
- Cubrir la placa e incubar por **5 minutos a temperatura ambiente (20–25°C) y en la oscuridad**.

8.5. DETENER

- Introduzca **100 µl de Solución de parada** en cada pocillo.

8.6. MEDICIÓN

- Después de mezclar suavemente (golpecitos ligeros den el borde de la placa), la extinción se mide a 450 nm dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de Solución de parada. Se recomienda una medición adicional en la longitud de onda de referencia de 620 nm.
- El valor cero debe compararse con la determinación del valor en blanco de sustrato. Si esto no es posible por razones técnicas, reste la extinción de este pocillo de todos los demás valores de extinción al evaluar para obtener resultados significativos.
- Si se han realizado determinaciones duplicadas o múltiples, calcule la media de los valores de extinción.

9. EVALUACIÓN DE PRUEBA

9.1. ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS – CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para cada medición, los controles positivo y negativo se deben llevar a cabo para garantizar la estabilidad de los reactivos y establecer si la técnica empleada es la correcta.

La Prueba due llevada correctamente cuando

- **Control Positivo** $1,0 < \text{Extinción} < 2,0$
- **Control Negativo** $\text{Extinción} < 0,1$

Una desviación de los valores requeridos puede, presentarse como una neblina o coloración azul de sustrato incoloro antes de la adición a los pocillos puede ser un indicio de un daño del reactivo. Si no se obtienen los valores especificados, debe ser controlado como paso siguiente antes de repetir la prueba:

- La vida útil de los reactivos utilizados
- Operatividad de los equipos utilizados (Calibración)
- El control visual de los componentes del kit de análisis, como contaminación o pérdidas; una solución de sustrato azulado no debe ser utilizado.

9.2. CALCULACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA

Los valores de extinción (VE) de las muestras se calculan con relación al Control Positivo (CP), que corresponde al 100 %.

$$\frac{100}{(VE\ CP / VE\ Muestra)} = xx\ \%$$

Ejemplo: Control Positivo VE 1,2

Muestra X VE 0,9

Muestra Y VE 0,03

Calculo de porcentaje: Muestra X: $\frac{100}{(1,2 / 0,9)} = 75\%$ Muestra Y: $\frac{100}{(1,2 / 0,03)} = 2,5\%$

9.3. EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA

Resultado positivo

Muestra cuyo valor porcentual es **superior al 11 %**.

Resultado límite (borderline) de la prueba

Muestra cuyo valor porcentual se encuentra **en el rango entre 5,6 y 11 %**. Si una prueba repetida después de 2 a 4 semanas con una prueba fresca también está en el límite/borderline, esta se evaluará como negativa.

Resultado negativo

Muestra cuyo valor porcentual es **inferior al 5,6 %**.

9.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

La interpretación del resultado del análisis obtenido se debe contemplar en el marco de la anamnesis, región endémica, la clínica y las posibilidades terapéuticas y profilácticas.

MegaELISA® FeLV Antigen = NEGATIVO → no viremia

- no (aprox. 95 %) o una infección latente del gato
- prueba < 4 semanas post infección

MegaELISA® FeLV Antigen = 1° resultado POSITIVO → sospecha de viremia

- infección transitoria o persistente
- gato no-infectado (falso positivo)

INDICACIÓN: Repetición de la prueba, pasados 4–8 semanas, hasta entonces se recomienda el aislamiento del gato (separador de FeLV!)

MegaELISA® FeLV Antigen = 2° resultado POSITIVO → viremia

→ **Diferenciación entre infección transitoria o persistente**

- **3° prueba pasadas 6 semanas**
- **4° prueba pasadas 10 semanas**

• **Resultado positivo → sospecha de una viremia persistente**

→ „Gato progresor“ con elevado riesgo de desarrollar enfermedades asociadas al FeLV.

• **Resultado se vuelve negativo → sospecha de una viremia transitoria**

→ „Gato regresor“ (eliminación completa del virus, sano)

→ **Infección latente** (integración del provirus en la médula ósea).

9.5. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La contaminación bacteriana o repetidos ciclos de congelación y descongelación de la muestra pueden afectar los valores de extinción.
- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe considerarse como la causa después de haber llevado a cabo, una sola prueba. Para un diagnóstico concreto debe tenerse en cuenta tanto la clínica, la sintomatología, así como datos serológicos y endémicos regionales.

10. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Usar ropa de protección (guantes) y lávese las manos después de haber concluido la ejecución de la prueba.
- No comer o beber durante la ejecución de la prueba.
- El material de la muestra y los controles deben ser considerados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo a las indicaciones estipuladas después de la ejecución de prueba.
- No utilizar los reactivos de otros fabricantes junto con este kit de análisis.
- No utilizar reactivos de lotes diferentes en el kit diagnóstico.
- No intercambie las tapas de los reactivos.
- Cerrar los frascos de reactivos después de su uso inmediatamente con el fin de evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrirlo por primera vez, verifique que no haya contaminación microbiana en el frasco de reactivo antes de seguir usando en el kit de análisis.
- El tampón de lavado, los controles y el conjugado contienen 0,045 % Proclin® 300 como conservante.
- El sustrato contiene agua oxigenada. **Debe evitarse el contacto con los ojos, la piel o las mucosas.**
- ATENCIÓN: ¡Los residuos líquidos que contienen la solución de parada deben neutralizarse antes de colocarlos en una solución de hipoclorito!
- Solo es de recomendar el uso de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- Nunca pipetear con la boca.
- Usar las etiquetas para la muestra y para el tubo de muestra asociado, de modo tal que se garantice la asignación exacta.
- Para cada muestra, utilizar un nuevo tubo de muestra.
- Durante las etapas de incubación y lavado, los pocillos deben ser cubiertos con el líquido completamente.
- Para evitar la contaminación cruzada y los resultados de prueba falsos, pipetear con cuidado las muestras y el conjugado en los pocillos.
- **MegaELISA® FeLV Antigen** ha sido diseñado y está pensado exclusivamente para su uso por personal calificado, que domina las buenas prácticas de laboratorio.

El procedimiento de prueba, la información, las precauciones y advertencias en las instrucciones que debe ser estrictamente observados. Cuando se utiliza el kit de prueba de dispositivos de diagnóstico, se validará el método de ensayo. No es recomendable cualquier cambio en el diseño, composición y procedimiento de la prueba, así como cualquier utilización en combinación con otros productos, que el fabricante no haya sido autorizado. El usuario es responsable por tales cambios. El fabricante no se hace responsable por los resultados falsos e incidentes asociados a estas indicaciones. No aceptara ninguna responsabilidad para cualquier resultado llevado a cabo por un evaluación visual o fotométrica.

11. RESPONSABILIDAD

Todo el riesgo relacionado con el uso de este producto es asumido por el comprador. El fabricante no se hace responsable de los daños indirectos, especiales o consecuentes que puedan resultar del uso, la ejecución y evaluación del análisis con este producto.

12. INSTRUCCIÓN DE USO ABREVIADA

PREPARACIÓN DE PRUEBA

Poner tiras de microtitulación y reactivos a **temperatura ambiente (20–25°C)**.

Diluir el tampón de lavado 1:10 con agua destilada.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Introduzca **2× 50 µl de Control Positivo y Negativo**
o **50 µl de las muestras plasma o suero sin dilución**
en un pocillo respectivo.



Cubrir e incubar **10 minutos a temperatura ambiente (20–25°C)**.



Lavar **4×** con **300 µl 1× de tampón de lavado**.



Introduzca **100 µl de Conjugado**
en un pocillo respectivo. Agitar suavemente.



Cubrir e incubar **10 minutos a temperatura ambiente (20–25°C)**
en la oscuridad.



Lavar **4×** con **300 µl 1× de tampón de lavado**.



Introduzca **100 µl de Sustrato (TMB)**
en un pocillo respectivo. Agitar suavemente.



Cubrir e incubar **5 minutos a temperatura ambiente (20–25°C)**
en la oscuridad.



Introduzca **100 µl de Solución de parada**
en un pocillo respectivo.



Evaluación fotométrica de los pocillos a 450 nm.