

MegaELISA® FIV ad us. vet.

**Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección cualitativa
de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia
felina (FIV) en el plasma o suero felino**

*Diagnóstico **in vitro***

INSTRUCCIONES DE USO

Fabricante:



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

MegaELISA® FIV 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 para la prueba	6
8. Procedimiento	7
9. Evaluación de prueba	8
10. Precauciones y advertencias	10
12. Responsabilidad	11
13. Instrucción de uso abreviada	12
Abreviaturas	2

Abreviaturas

- DLM Diluyente para la muestra
- H₂O₂ Agua oxigenada
- MMD Mezcla de muestra con diluyente
- PRP Peroxidasa de rábano picante
- TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

1. INTRODUCCIÓN

La inmunodeficiencia adquirida felina (SIDA felino) es causada por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y se distribuye mundialmente entre los félidos. La prevalencia puede variar sobre todo según el confinamiento (sobre todo de gatos callejeros o gatos con libre acceso al exterior) desde un 2–3% en Alemania hasta más de un 30% en Italia y un 44% en Japón.

La transmisión con fluidos corporales portadores de FIV, sangre o componentes sanguíneos, normalmente se produce por vía parenteral (por lesiones de mordeduras, transfusiones sanguíneas, cópulas con consecuente mordedura en la nuca) así como por vía transplacentaria y perinatal a la sangre de gatos sanos. Los machos con libre acceso al exterior y fuerte comportamiento territorial se consideran “animales de riesgo” con niveles de infecciones significativamente superiores.

La fase inicial de la infección (linfonodos agrandados, fiebre, neutropenia, etc.) a menudo pasan como clínicamente desapercibida. A esta fase le sigue a menudo un período de latencia asintomático. No es hasta la siguiente fase, en la que se producen síntomas clínicos inespecíficos que están causados en primera línea por diversos síntomas secundarios (p. ej., estomatitis, enfermedades tumorales, modificaciones oculares inflamatorias, anemia y leucopenia) y menos por el propio virus (p. ej., síntomas neurológicos, linfomas).

Debido a la fase inicial relativamente asintomática, la fase de latencia asintomática y el hecho de que aprox. 95% de los gatos infectados por FIV a las 4 semanas post infección muestran elevadas concentraciones de anticuerpos contra FIV en sangre, la detección de anticuerpos contra FIV es un importante método diagnóstico rutinario de una potencial infección por FIV.

Basado en proteínas recombinantes de FIV altamente específicas, el **MegaELISA® FIV** es un valioso método diagnóstico para identificar los casos de sospechas clínicas o por medio de la anamnesis de FIV.

2. INDICACIÓN DE USO

El **MegaELISA® FIV** es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) en el plasma o suero felino.

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El **MegaELISA® FIV** se basa en la detección por medio de un inmunoensayo cualitativo de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) por medio de un el principio sándwich.

Los antígenos FIV recombinantes se unen a la superficie de los pocillos de la placa de microtitulación. Las muestras diluidas 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-felino 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 absorbancia de la solución amarilla en la placa de microtitulación es proporcional a la concentración de anticuerpos contra FIV presente 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 96 determinaciones.

1. **Placa de microtitulación con 96 determinaciones** (12 tiras separables con 8 pocillos cada uno, en el bastidor de soporte), recubiertos con antígenos de FIV recombinantes
2. **100 ml Diluyente para la muestra DLM**, listo para su uso, **tapa morada**
3. **60 ml Tampón de lavado (10×)**, **tapa azul**
4. **4 ml Control Positivo**, listo para su uso, **tapa transparente con punto rojo**
5. **4 ml Control Negativo**, listo para su uso, **tapa transparente con punto azul**
6. **15 ml Conjugado** (Anticuerpos anti-felino, marcados con peroxidasa de rábano), listo para su uso, **tapa azul**
7. **15 ml Sustrato** (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina [TMB]/agua oxigenada [H₂O₂]), listo para su uso, frasco marrón, **tapa marrón. No exponer a la luz directa del sol.**
8. **15 ml Solución de parada** (0,2 M ácido sulfúrico), listo para su uso, **tapa blanca**
9. **1 hoja de evaluación**
10. **1 papel de plástico para cubrir**
11. **1 instrucciones de uso**

4.2. COMPONENTES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada
- Vortex-Mixer/Mezclador vortex
- Papel de filtro/toallitas 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, probablemente 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

LOT

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.

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 incoloro, 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 de 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 tinción 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 pipeteador 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 las 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 utilizados, no deben ser reutilizados.
- Todos componentes del kit de análisis dañados no podrá ser utilizados.
- Un contacto directo de la muestra con los componentes del kit de análisis debe ser evitado (contaminación cruzada).
- Evite la luz solar directa durante la prueba.

7.2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO 1:10

Una parte de tampón de lavado concentrado (60 ml) se mezclan con 9 partes de agua destilada (540 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 diluido se puede almacenar a 2–8 °C durante un año.

7.3. PREPARACIÓN/DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS 1:200 O 1+199

- Las muestras analizadas se diluyen inicialmente 1:200 con Diluyente para la muestra (DLM), por ejemplo, 5 µl muestra + 995 µl DLM.
- Homogeneizar la mezcla de muestra con diluyente (MMD) optimalmente (repetida mezcla con la pipeta o en un mezclador vortex).
- **ATENCIÓN:** Al usar un lavador para ELISA, las muestras se deben estar libre de partículas. Para asegurar esto, introduzca las muestras en la centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Para la titulación de muestras, la dilución en serie debe comenzar con una dilución de 1:200.
- Los controles están listos para usar y no deben diluirse.

8. PROCEDIMIENTO

- Homogeneizar el material de las mezclas de muestras con diluyente (MMD) y Conjugado 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 de soporte.
- Introduzca en cada pocillo
 - 100 µl de Control Positivo (2×)
 - 100 µl de Control Negativo (2×)
 - 100 µl de las muestras diluidas/MMD (2×)en el orden que van a ser analizadas y en el respectivo pocillo de la tira de microtitulación.
- Agite suavemente la placa de microtitulación, luego cubra la placa de microtitulación 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.
- Evierte varias veces sobre un papel de laboratorio/pañó absorbente la placa de microtitulación.
- Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado por pocillo.
- **Completamente vacío entre cada ciclo de lavado y luego agitar cuidadosamente varias veces en una oficina sin usar seca.**

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 la placa de lavado a fondo utilizar un papel secante de laboratorio/tela. 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.
- Agite suavemente la placa de microtitulación, luego cubra la placa de microtitulación e incubar por **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C)**.

8.4. LAVADO

Lavar como en el punto 8.2

8.5. TERCERA INCUBACIÓN

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

8.6. DETENER

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

8.7. MEDICIÓN

- Después de mezclar suavemente (golpecitos ligeros en el borde de la placa), la absorbancia 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 del sustrato. Si esto no es posible por razones técnicas, reste la absorbancia de este pocillo de todos los demás valores de absorbancia al evaluar para obtener resultados significativos.
- Si se han realizado determinaciones duplicadas o múltiples, calcule la media de los valores de absorbancia.

9. EVALUACIÓN DE PRUEBA

9.1. ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS – CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

La PRUEBA fue llevada correctamente cuando

- **Control Positivo** Extinción > 0,8
- **Control Negativo** Extinción < 0,1

Una desviación de los valores requeridos puede, presentarse como una neblina o coloración azul del 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 y no debe ser utilizado.

9.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

Valores de corte (Cut-off):

Cut-off positivo = Extinción (Control Negativo) + 0,28

Cut-off negativo = Extinción (Control Negativo) + 0,2

Resultado positivo

Muestra cuyo valor de extinción es mayor al valor de corte (Cut-off) positivo.

Resultado límite (borderline) de la prueba

Muestra cuyo valor de extinción es por debajo de los puntos de Cut-off. En este caso, se recomienda repetir la prueba después de 3–4 semanas con una nueva muestra. Si no hay seroconversión y la extinción no es superior al Cut-off positivo, la muestra debe considerarse negativa.

Resultado negativo

Muestra cuyo valor de extinción es menor al valor de corte (Cut-off) negativo.

9.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

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

MegaELISA® FIV = NEGATIVO

➔ Deficiencia de anticuerpos contra FIV

- Gato no infectado
- Gato infectado en estado inicial (falta de aumento del título de anticuerpos de Ø hasta 4 semanas [aprox. 95 %], pero también hasta 1 año post infección).
- Gato en el estadio final de la enfermedad (insuficiente formación de anticuerpos → Concentración por debajo del límite de detección de la prueba).

MegaELISA® FIV = resultado 1× POSITIVO

➔ presencia de anticuerpos contra FIV

- Gato infectado, virémico (> 6 meses)
- Gato menor de 6 meses (anticuerpos maternos)

➔ al titular la muestra

- el título de anticuerpos de la muestra analizada corresponde al nivel de dilución más alto en el que la absorbancia medida es más alta que el límite positivo

9.4. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La contaminación bacteriana o repetidos ciclos de congelación y descongelación de la muestra pueden afectar los valores de absorbancia.
- 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.
- Evite toda contaminación microbiana de los reactivos.
- 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 Diluyente para la muestra, el Tampón de lavado, los controles y el conjugado contienen 0,045 % Proclin® 300 como conservante.
- – El Solución de parada contiene 0,2 M ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico irrita al contacto con los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuague bien con agua y consulte a un médico. Mantener fuera del alcance de los niños.
- – 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 asociada, 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® FIV** ha sido diseñado < 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 análisis 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 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 aceptamos ninguna responsabilidad para cualquier resultado llevado a cabo por una 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.

Diluir las muestras 1:200 con DLM (5 µl de muestra + 995 µl DLM).

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Introduzca **2× 100 µl de Control Positivo y Negativo**
o **100 µl de las muestras plasma o suero diluyentes**
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** cada uno.



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



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



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



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.