

**ELABORACIÓN DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA
PRUEBA DE ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A
ENZIMAS (ELISA), EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE LA CLÍNICA
VETERINARIA “CARLOS MARTÍNEZ HOYOS” DE LA UNVERSIDAD
DE NARIÑO**

ARTURO MAYA OLIVA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2011**

**ELABORACIÓN DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA
PRUEBA DE ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A
ENZIMAS (ELISA), EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE LA CLÍNICA
VETERINARIA “CARLOS MARTÍNEZ HOYOS” DE LA UNIVERSIDAD
DE NARIÑO**

ARTURO MAYA OLIVA

**Informe final de semestre rural presentado como requisito parcial
para optar al título de Médico Veterinario**

Asesora:

M. V. Esp. KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2011**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad del autor”

Artículo 1 del Acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

MVZ. Esp. Héctor Fabio Valencia Ríos
Jurado Delegado

MVZ. Esp. José Rafael Rosero Muñoz
Jurado Evaluador

MV. Esp. Katia Benavides Romo
Asesora

San Juan de Pasto, Agosto de 2011.

DEDICATORIA

A la familia Maya Oliva, gracias por confiar en mí; apoyarme en todo momento, por su motivación, valores y consejos que me han inspirado para salir adelante.

Y a las personas que compartieron su conocimiento y tiempo para el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme fuerzas para salir adelante ante la adversidad.

A mis padres por su determinación, entrega y humildad que me han enseñado tanto, y a mis hermanas por sus enseñanzas y buen ejemplo.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	19
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GENERAL:	22
3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
4. MARCO TEÓRICO.....	23
4.1 CONFORMACIÓN DEL MANUAL	24
4.1.1 Identificación.	24
4.1.2 Índice o contenido	24
4.1.3 Prólogo y/o introducción	24
4.1.4 Objetivos de los procedimientos.....	24
4.1.5 Áreas de aplicación y/o alcance de los procedimientos	24
4.1.6 Responsables.....	24
4.1.7 Políticas o normas de aplicación	24
4.1.8 Conceptos	24
4.1.9 Procedimiento.....	24
4.1.10 Formulario de impresos.....	24
4.1.11 Glosario de términos	24
4.1.12 Fuentes de información.	24
5. DISEÑO METODOLÓGICO	25
5.1 LOCALIZACIÓN.....	25
5.2 INSTALACIONES Y EQUIPOS.....	25

5.3 PROCEDIMIENTO	25
5.3.1 Diagnóstico..	25
5.3.2 Revisión Bibliográfica.	25
5.3.3 Estructuración del manual.....	25
5.3.4 Socialización.	26
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
7. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES.....	73
7.1 CONCLUSIONES.....	73
7.2 RECOMENDACIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	77

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. ELISA Directa.....	45
Figura 2. ELISA Indirecta.....	47
Figura 3. ELISA Sándwich Directa.....	50
Figura 4. ELISA Sándwich Indirecta.....	53
Figura 5. Almacenamiento de reactivos Kit de ELISA, SVNOVIR®.....	57
Figura 6. Kit de ELISA, SVNOVIR®.....	58
Figura 7. Kit de ELISA, SVNOVIR®.....	58
Figura 8. Microplacas (antígeno Inmovilizado en los pocillos).....	58
Figura 9. Microplacas 8/12 pocillos.....	59
Figura 10. Reactivo HRP (Peróxidasa de rábano picante).....	59
Figura 11. Solución de PBS- Tween 20.....	60
Figura 12. Solución substrato (TMB).....	60
Figura 13. Solución de Frenado (H ₂ SO ₄).....	61
Figura 14. STAT FAX 2200-INCUBADOR/SHAKER.....	63
Figura 15. STAT FAX 2600- Lavador.....	63
Figura 16. STAT FAX 2600-Lavador.....	64
Figura 17. STAT FAX 3200- lector.....	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Procedimiento ELISA Directa.....	44
Tabla 2 Procedimiento ELISA Indirecta.....	48
Tabla 3 Procedimiento ELISA Sándwich Directa.....	51
Tabla 4 Procedimiento ELISA Sándwich Indirecta.....	54
Tabla 5. Interpretación de Resultados Incubación Corta.....	67
Tabla 6. Interpretación de Resultados Incubación Larga.....	67

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO A. Manual de procedimientos para la prueba DE ELISA	28
ANEXO B. Registro de mantenimiento STAT FAX 2200.....	77
ANEXO C. Registro de mantenimiento STAT FAX 2600.....	78
ANEXO D. Registro de mantenimiento STAT FAX 3200.....	79
ANEXO E. Inserto kit de ELISA, SVANOVA.....	80

GLOSARIO

ABSORCIÓN: el proceso de la adición de un antígeno o anticuerpo, se diluye en tampón, por lo que concede pasivamente a la fase sólida en la incubación. Esta es una forma sencilla para inmovilización de uno de los reactivos en la prueba ELISA y una de las principales razones de su éxito.

ANTICUERPOS: se producen en respuesta a estímulos antigénicos. Se trata principalmente de naturaleza proteica. A su vez, los anticuerpos son antigénicos.

ANTÍGENOS: una proteína o carbohidratos que cuando se inyectan en animales provoca la producción de anticuerpos. Tales anticuerpos pueden reaccionar específicamente con el antígeno utilizados y por lo tanto puede ser utilizado para detectar este antígeno.

CONJUGADO ENZIMÁTICO: enzima que se une irreversiblemente a una proteína, por lo general un anticuerpo.

ELISA: técnica desarrollada para efectuar análisis que permiten determinar si una sustancia se encuentra presente en una muestra. Se utiliza principalmente en el área de inmunología. La palabra ELISA es el acrónimo de las palabras en lengua inglesa Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ENZIMA: proteína que sirve de catalizador en una reacción química, acelerando las reacciones.

ESPECIES CONTRA ANTICUERPOS: se producen cuando las proteínas (anticuerpos) de una especie se inyectan en otra especie.

FLUORÓFORO: moléculas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten luz de una longitud de onda mayor.

LAVADOR DE ELISA: equipo que se utiliza para lavar las placas durante las etapas de una prueba de ELISA, con el fin de remover aquellos componentes que no se han unido en las reacciones. El lavador de ELISA utiliza buffers especiales en los procesos de lavado.

LAVADO: las inundaciones simples y vaciado de los pozos con una solución tamponada de reacción y consolidados (sin reaccionar) los reactivos de la prueba ELISA.

LECTURA: la medición de color que se produce en el ELISA. Esto se cuantifica con espectrofotómetros de lectura en diferentes longitudes de onda de los colores específicos obtenidos con la enzima en particular sistemas de cromóforo.

LECTOR DE MICROPLACAS: nombre dado a los analizadores de ELISA.

PLACA DE ELISA: elemento de consumo que se ha estandarizado para efectuar los análisis mediante la técnica de ELISA. Las placas tienen en general 96 pozos en una configuración típica de 8 filas por 12 columnas. También hay placas de ELISA de 384 y recientemente se han venido imponiendo microplacas de hasta 1 536 pozos, en centros de alta demanda, debido a las economías logradas en insumos y reactivos.

PARADA: el proceso de detener la acción de una enzima en una sub-estrategias. Tiene el efecto de la interrupción de cualquier otro cambio de color en el ELISA.

QUIMIOLUMINISCENCIA: emisión de luz que aparece durante una reacción química.

SUSTRATO: un compuesto químico con una enzima que reacciona específicamente. Esta reacción se utiliza, de alguna manera, para producir una señal que se lee como una reacción de color (directamente como un cambio de color del sustrato o indirectamente por su efecto sobre otra sustancia química).

RESUMEN

Pruebas complementarias de carácter científico como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), son herramientas de utilidad para el diagnóstico médico veterinario, el beneficio radica en que ofrece resultados confiables, oportunos y exactos. Un manual de procedimientos permite homogenizar, ordenar y tener un conocimiento preciso del principio que rige la prueba, para obtener un mejor desempeño en la obtención de resultados, manejo de equipos y desarrollo de procedimientos propios de la prueba.

El proyecto se realizó en el Laboratorio Clínico de Diagnóstico de la Clínica Veterinaria Carlos Martínez Hoyos de la Universidad de Nariño; en donde se sistematizaron y ordenaron los procedimientos que se realizan en esta técnica de diagnóstico, también se detallan los principios que la rigen, conjuntamente es de importancia como parte integral del proceso de control de calidad interno del laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño. Para esto se agotaron cuatro etapas: Diagnóstico, revisión bibliográfica, estructuración de los manuales y sociabilización.

Este manual de procedimiento permitirá obtener una información precisa sobre la variabilidad y exactitud de la prueba de ELISA, el principio científico que la precede, y los requerimientos básicos para el montaje de las muestras.

ABSTRACT

Investigations of a scientific nature as linked immunosorbent assay (ELISA) are useful tools for diagnosing veterinarian; the benefit is that it provides reliable results, timely and accurate. A manual of procedures allows homogenizing, order and have a precise knowledge of the principle governing the test, for better performance in achieving results, team management and development of procedures of the test.

The project was conducted in the clinical laboratory diagnosis of Veterinary Clinical Hoyos Carlos Martínez of the University of Nariño, where systematized and ordered the procedures performed in this diagnostic technique, also details the principles that govern together is of importance as an integral part of the process of internal quality control Laboratory of the Veterinary Clinic at the University of Nariño. For this sold out four stages: diagnosis, literature review, structuring of the manuals and socialization.

This procedures manual will allow you to get accurate information on the variability and accuracy of the ELISA test, the scientific principle that precedes it, and the basic requirements for the assembly of the samples.

INTRODUCCIÓN

Pruebas complementarias de carácter científico como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA, son herramientas de utilidad para el diagnóstico Médico Veterinario, su utilidad reside en que nos ofrecen resultados confiables, oportunos y exactos. Estos permiten acercarse de una manera veraz al diagnóstico. Así mismo, en muchos casos es determinante para la elección de tratamientos, y pueden ser la medida exacta entre la vida y muerte de los pacientes, como también el desarrollo métodos de prevención de enfermedades de tipo contagioso y zoonótico.

Este manual se ha desarrollado con el fin de apoyar al personal que labora en el laboratorio clínico o en investigaciones en el campo de la salud animal, en la comprensión de los requerimientos técnicos relacionados con la instalación, uso y mantenimiento de un grupo de equipos que resultan de gran importancia para la realización de las actividades diagnósticas o de investigación.

No se pretende que los lineamientos incluidos en este manual conviertan a quien lo consulta en un experto capaz de solucionar cualquier problema que pueda presentarse en el equipamiento del laboratorio. El desarrollo alcanzado a nivel tecnológico y científico ha incorporado en los equipos infinidad de funciones y modos particulares de operación, que necesariamente conllevan a implementar programas que permitan aportar los recursos para mantener dicho equipamiento en las mejores condiciones de operación. Por la diversidad de orígenes, marcas y modelos, solo es posible presentar unas recomendaciones generales, dado que las particulares se encuentran desarrolladas en los manuales de uso, mantenimiento e instalación elaborados por los fabricantes.

Un manual de procedimiento permite homogenizar, ordenar y tener un conocimiento preciso del principio de la prueba, así como también, es el primer paso para estandarizar la prueba a desarrollar y con ello ganar en calidad. En la actualidad aún no se ha realizado un manual de procedimientos que permita al personal del laboratorio tener una guía mínima en el montaje de la prueba de ELISA que garanticen su calidad y a los estudiantes un material académico que puedan confrontar en la práctica diaria en laboratorio. Adicionalmente este tipo de guías garantizan el cumplimiento de parámetros mínimos de seguridad en el manejo de biológicos.

Uno de los problemas más comunes que se presentan en el laboratorio es el “error humano”. Saberlo reducir a su mínima expresión, siguiendo un protocolo sistemático y científico, desde la forma (fase pre-analítica), pasando por el procesamiento de la muestra (fase analítica) y el análisis de sus resultados (fase post-analítica) permitirá al Laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño, ofrecer un mejor servicio, de calidad y competitivo en el ámbito Médico Veterinario del departamento de Nariño.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las pruebas que se llevan a cabo en un laboratorio clínico veterinario, permiten al médico un trabajo serio, sistemático y confiable; el cual mediante su conocimiento clínico y la aplicación de pruebas de laboratorio; puede confirmar sus conjeturas referentes al cuadro clínico que presente su paciente, orientando de una manera más confiable su diagnóstico y tratamiento, por lo tanto el médico veterinario que no hace uso de estas herramientas, está relegado por la sociedad médica que avanza cada vez mas. Por otro lado son los laboratorios quienes deben asegurar una confiabilidad para los profesionales del área generando calidad de diagnostico en los servicios que presta.

En la actualidad el Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño no posee un manual de procedimiento para el Funcionamiento del Equipo de ELISA, que permitan homogenizar los procedimientos propios de la prueba y elevar sus servicios en términos de calidad y competitividad frente a otros laboratorios. Con el manual ajustado a las necesidades técnicas de este y en especial la Universidad de Nariño logrará un mejor posicionamiento como frente académico y práctico en esta área; logrando una mejor armonización con la red de laboratorios de diagnóstico veterinario.

La normatividad vigente relacionada con el registro y certificación de laboratorios de diagnóstico veterinario ante el ICA, “Resolución 001599 de 2007”, dispone en sus considerandos:

- Que es necesario con una red de laboratorios de diagnóstico veterinario con criterios de desempeño armonizados para optimizar su funcionamiento.
- Los laboratorios veterinarios deben cumplir con las normas mínimas de calidad para poder aceptar como válidos los resultados analíticos que se emitan.
- Que con el fin de ejercer el control técnico de los resultados emitidos a los productores pecuarios, establecer la implantación de normas mínimas de calidad en los laboratorios que manipulan

microorganismos patógenos y no patógenos o material genético derivado y minimizar los riesgos que puedan generarse de estos laboratorios a la salud animal, humana, y el ambiente, es necesario establecer las normas a las cuales se deben sujetar toda persona natural o jurídica.¹

Los responsables del control de los laboratorios veterinarios (ICA, Dirección Municipal de Salud, Dirección Científica de Laboratorio Clínico Veterinario UDENAR) en los últimos tiempos han dispuesto una serie de requisitos con el fin de unificar políticas de calidad en el servicio y garantizar un uso pertinente y ajustado a las leyes ambientales en materia de los residuos de laboratorio, con lo que el manual de procedimientos que contengan lineamientos básicos para este manejo contribuirá al cumplimiento de dichos requerimientos, así como, a la conservación del medio ambiente en los términos establecidos por las leyes.

Este manual de procedimiento permitirá obtener información precisa sobre la variabilidad y exactitud de la prueba, el principio científico que la rige, los requerimientos básicos para su montaje.

Con el manual de los procedimientos instalado es más fácil hacer comparaciones de las técnicas con laboratorios a nivel nacional e incluso internacional en esta área, hacer los ajustes necesarios, con el consecuente reconocimiento y su aporte a la unificación de criterios médicos.

El manual de procedimientos contempla el uso correcto de las buenas prácticas de laboratorio garantizan tanto a sus funcionarios como a demás (compañeros de trabajo, estudiantes, público en general) un ambiente tranquilo y seguro con respecto a los riesgos inherentes de los laboratorios de diagnóstico.

¹ ICA____Resolución 1599 de 2007, artículo 19.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Clínica Carlos Martínez Hoyos de la Universidad de Nariño no existe un manual de procedimientos para la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), como parte esencial en el proceso de calidad interno.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Elaboración de un manual de procedimientos para la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), como parte integral del proceso de control de calidad interno del Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos”.

3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar las pautas del procedimiento de la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con el fin de optimizar su aplicación y funcionamiento.
- Establecer el protocolo a seguir para la toma, identificación y transporte de muestras serológicas.
- Socializar el manual de procedimientos de la prueba de ELISA, para su aprobación e implementación en el laboratorio de diagnóstico.

4. MARCO TEÓRICO

Un manual de procedimientos es un documento que pretende generar descripción de actividades que deben seguirse en la elaboración de las funciones de un procedimiento científico, o más de ellos.

Describe el método y orden secuencial de las actividades o pasos que se siguen para desarrollar una función, integrando en forma ordenada los procedimientos, de acuerdo con una metodología propia de la prueba, que permita conocer el funcionamiento o su forma de operación.

En él se encuentra impresa y documentada la información necesaria para la aplicación de la técnica a implementarse, de tal manera que se facilita las labores de comprobación y evaluación. Sirve como elemento de consulta para los responsables de laboratorio y documento guía.

La elaboración del Manual de Procedimientos es una tarea exhaustiva y minuciosa, que requiere diseñar la metodología mínima necesaria que conduzca en el menor tiempo posible a su elaboración. Con este propósito, a continuación se ilustran algunos de los puntos fundamentales que habrán de seguirse para su realización.²

Los pasos fundamentales para la elaboración de un manual de procedimientos son:

- La Investigación es necesaria al planear las acciones pertinentes respecto a la identificación, captación, y diseño de los programas donde se consignen los requerimientos, fases y procedimientos que fundamentan la ejecución del mismo, para definir o conocer sus características, propiedades, alcances o fines, e influir en su contenido.
- El Análisis es una categoría metodológica que permite estudiar y distinguir las partes de un todo, además de identificar y conocer los principios, los elementos y los fines, y contar así con las bases y los conocimientos necesarios para proceder.

² PALMA. JOSE, Manual de procedimientos. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos13/mapro/mapro.shtml>.

- El diseño de una metodología y técnicas con orden, secuencial de los pasos, actividades u operaciones que son procesadas de forma manual, electrónica o sistemáticamente con apoyo de medios modernos de tecnología de la información.³

Su utilidad reside en que nos permite conocer las actividades que se realizan durante el montaje de una técnica dentro del laboratorio por lo que organiza metódicamente tanto las responsabilidades del personal a cargo como el manejo ordenado y técnico en términos de descripción del montaje de dicha prueba, de esta manera ayudaría en la inducción o capacitación de posible nuevo recurso humano del área; también facilita labores de auditoría interna y externa, eleva la capacidad de funcionamiento de los profesionales que presentan el servicio.

4.1 CONFORMACIÓN DEL MANUAL

4.1.1 Identificación.

4.1.1.1 Logotipo de la organización.

4.1.1.2 Nombre oficial de la organización.

4.1.1.3 Denominación de la extensión. De corresponder a una unidad en particular debe anotarse al nombre de la misma.

4.1.1.4 Lugar y fecha de elaboración.

4.1.1.5 Unidades responsables de su elaboración.

4.1.2 Índice o contenido

4.1.3 Prólogo y/o introducción

4.1.4 Objetivos de los procedimientos.

4.1.5 Áreas de aplicación y/o alcance de los procedimientos

4.1.6 Responsables.

4.1.7 Políticas o normas de aplicación

4.1.8 Conceptos

4.1.9 Procedimiento.

4.1.10 Formulario de impresos

4.1.11 Glosario de términos

4.1.12 Fuentes de información.⁴

³ Ibid., <http://www.monografias.com/trabajos13/mapro/mapro.shtml>

⁴ Ibid., <http://www.monografias.com/trabajos13/mapro/mapro.shtml>.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño - Pasto.

5.2 INSTALACIONES Y EQUIPOS

En donde se cuenta con los equipos STAT FAX 3200-LECTOR, STAT FAX 2200-INCUBADOR/SHAKE, STAT FAX 2600-LAVADOR y técnicas de apoyo de la prueba diagnóstica ELISA, contemplados en este manual.

Las instalaciones deben cumplir con las normas de bioseguridad para la manipulación de muestras. También disponer de un espacio propio para montar esta prueba, mesones fijos, fuentes de energía eléctrica, estabilizadores, un centro de cómputo para la recopilación y manejo de datos reportados por el equipo STAT FAX 3200-LECTOR.

5.3 PROCEDIMIENTO

El presente proyecto se desarrolló en las siguientes etapas:

5.3.1 Diagnóstico. Este paso incluyó la evaluación de la situación de cada uno de los protocolos y manuales de procedimiento, así como, la determinación de acuerdo a la necesidad de los nuevos protocolos. Bajo la asesoría de la dirección científica del laboratorio y al margen de la normatividad requerida para la certificación.

5.3.2 Revisión Bibliográfica. Consistió en la documentación de cada procedimiento de tal manera que el manual contemple no solo el principio de la prueba si no que esta actualizado y es coherente con el contexto del laboratorio.

5.3.3 Estructuración del Manual. Es la conformación del manual de procedimientos de acuerdo a la normatividad vigente y a las necesidades del laboratorio.

5.3.4 Socialización. Una vez estructurado el manual, la socialización pretende dejar en claro las actualizaciones, modificaciones y anexos de los procedimientos a todo el equipo de trabajo del laboratorio que garantice la efectividad de los mismos y la calidad del servicio.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Manual de procedimientos para la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas adjunto **Anexo A**.



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE ELISA.

Arturo Maya Oliva



Universidad de Nariño
Programa de Medicina Veterinaria
Facultad de Ciencias Pecuarias
San Juan de Pasto
Agosto de 2011

INTRODUCCIÓN

El Laboratorio de la Clínica Veterinaria “ Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño inició labores en el año de 1995; desde entonces y hasta el momento ha desarrollado una serie de actualizaciones técnicas e implementación de nuevas pruebas y nuevos equipos que le permitieron hoy brindar un servicio de calidad.

Es un laboratorio que se ubica según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud como de GRUPO DE RIESGO 2 y según sus características de diseño, construcción como LABORATORIO BASICO – NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2; con capacidad para montar pruebas Hematológicas, Parasitológicas, Serológicas, Citológicas, Microbiológica y Uroanálisis.

Su acción está orientada dentro de la misión visión de la Universidad de Nariño de tal suerte que ofrece a sus servicios a pacientes de nuestra misma clínica, remisiones de clínicas veterinarias de la ciudad de Pasto, ganaderos de Nariño y parte del Putumayo, ofrece también el servicio de asesoría veterinaria profesional a estudiantes del programa de Medicina Veterinaria de la Universidad cumpliendo así su función académica.

Este manual se estructura en la clínica a cargo del Dr. Darío Cedeño Quevedo, la Dirección Científica del Laboratorio de la Dra. Katia Benavides Romo, la asesoría de la Dra. Nancy Galindes Santander y la investigación y formulación del manual del auxiliar de laboratorio Arturo Maya Oliva.

El presente manual integra los procedimientos básicos para el montaje de la prueba de ELISA, tomando como referencia las condiciones propias del Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño y contiene los procedimientos básicos para el apropiado montaje del ensayo de diagnóstico. Detallada en forma lógica, ordenada y sistemática. Su contenido es de fácil comprensión para el personal adscrito al área de laboratorio de la Clínica Veterinaria así como a estudiantes del programa de Medicina Veterinaria de la Universidad de Nariño.

OBJETIVOS

1. Establecer el procedimiento básico de la prueba de ELISA, y su aplicación en los equipos STAT FAX 3200-LECTOR, STAT FAX 2200-INCUBADOR/SHAKE, STAT FAX 2600-LAVADOR con fines diagnósticos de tipo patológico, inmunológico y nivel hormonal en las diferentes especies domesticas.
2. Dotar al laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño un elemento indispensable para el control de calidad, así como una guía de apoyo académico para los estudiantes del programa de la Universidad de Nariño.
3. Determinar la técnica adecuada para el montaje de la prueba.

1- PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).

a. ÁREAS DE APLICACIÓN.

La aplicación del manual de procedimientos en el montaje de la prueba de ELISA con el equipo STAT FAX, es un instrumento para ser usado en el diagnóstico clínico in-vitro; para que sea de utilidad al personal técnico y profesional del laboratorio clínico, la estandarización del procedimiento dentro del Laboratorio de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Nariño, es un referente para otros laboratorios de diagnóstico veterinario en la región y otros departamentos.

Es útil como herramienta académica para estudiantes de pregrado, profesores del programa y demás profesionales interesados en el área de laboratorio clínico veterinario.

b. ALCANCE DEL PROCEDIMIENTO.

El procedimiento puede ser aplicado en las diferentes especies domésticas como son: caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos, aves, animales silvestres entre otras.

Con fin diagnóstico: patológico (confirmando la presencia en el organismo de antígenos o anticuerpos de un agente infeccioso, vacunal (titulación de vacunas o autoanticuerpos), hormonal (niveles hormonales), detección de moléculas (medicamentos).

c. RESPONSABLES

1. El director de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos”.
2. El director científico del Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos”.
3. El personal técnico y profesional del Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos”.

d. CONCEPTOS

Absorción: proceso de la adición de un antígeno o anticuerpo, el cual se diluye en el tampón, por lo que confiere pasivamente a la fase sólida en la incubación. Esta es una forma sencilla para la inmovilización de uno de los reactivos en la prueba ELISA y una de las principales razones de su éxito.

Anticuerpos: son formas solubles de naturaleza proteica del receptor para un antígeno de la célula secretadas por estas al ser estimuladas por el antígeno.

Antígenos: es una sustancia capaz de provocar una respuesta inmune, es decir, que estimula la formación de una proteína específica contra este antígeno.

Conjugado enzimático: una enzima que se une irreversiblemente a una proteína, por lo general un anticuerpo.

Colorimetría: es la ciencia que estudia la medida de los colores y que desarrolla métodos para la cuantificación del color, es decir la obtención de valores numéricos del color.

ELISA: es la técnica desarrollada para efectuar análisis que permiten determinar si una sustancia se encuentra presente en una muestra. Se utiliza principalmente en el área de la inmunología. La palabra ELISA es el acrónimo de las palabras en la lengua inglesa Enzyme-linked immunosorbent Assay.

Enzima: son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles.

Estandarizar: “tipificar” (ajustar a un tipo o norma), tipificar: “ajustar varias cosas a un tipo o norma común.

Espectrofotometría: es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Fase Sólida: son preparados comerciales disponibles como placas de ELISA. Estos tienen un formato de 8 x 12 fosas se puede utilizar con una amplia variedad de equipos especializados, diseñados para la manipulación rápida de muestras, incluyendo pipetas multicanal.

Fluoróforo: son moléculas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten luz de una longitud de onda mayor.

Lectura: es la medición de color que se produce en el ELISA. Esto se cuantifica con espectrofotómetros de lectura en diferentes longitudes de onda de los colores específicos obtenidos con la enzima.

Quimioluminiscencia: es la emisión de luz que aparece durante una reacción química. Fenómeno que en algunas reacciones químicas la energía liberada no sólo se emite en forma de calor o de energía química sino en forma de luz.

Parada: es el proceso para detener la acción de una enzima en una reacción química. Tiene el efecto de la interrupción de cualquier otro cambio de color en el ELISA.

Sustrato: es una molécula sobre la que actúa una enzima, que altera el color como resultado de su interacción (directamente como un cambio de color del sustrato o indirectamente por su efecto sobre otra sustancia química).

e. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO.

INFORMACIÓN SOBRE LAS MUESTRAS MUESTRA DE SANGRE

El sitio de punción debe estar limpio y libre de patógenos, esto incluye recortar el pelo, lavarlo con jabón, detergente o solución yodada en dos veces y después realizar una limpieza con alcohol. La asepsia debe realizarse en sentido contrario al crecimiento del pelo del animal y en forma circular del centro hacia la periferia. Después de la punción el sitio

debe dejarse seco, limpio y libre de sangre ya que cualquier humedad o materia orgánica favorece las infecciones.⁵

1. Sitio:

Vena yugular: Se usa más frecuentemente en el caballo, bovinos, ovejas, cabras y grandes mamíferos salvajes; en ocasiones se usa en perros, gatos, conejos, ratas, y hámster, conejillos de indias y pájaros.

Con el perro sentado, un ayudante detiene la mandíbula inferior con una mano y le voltea la cabeza hacia arriba y ligeramente de lado. El operador coloca el pulgar de la mano izquierda en el surco yugular para ocluir y anclar la vena yugular, mientras manipula la jeringa y la aguja con la mano derecha.

Para lo cual se debe:

Limpiar el sitio en donde se va a tomar la muestra, sobre todo en los animales de pelo largo.

Las venas se localizan más fácilmente cuando se fricciona el sitio de punción con alcohol.⁶

Vena cefálica: el sitio que se usa con mayor frecuencia para la extracción de pequeñas cantidades de sangre en el perro.

Para lo cual se debe: Constreñir el área del aspecto dorsal de la extremidad anterior a nivel del codo se puede elevar la vena cefálica, empezando justo por encima de la articulación carpiana.⁷

Vena auricular: puede usarse en el gato, perro pequeño, cerdo conejo, conejillo de indias, mono y Chinchilla.

Por lo general se utiliza una vena auricular marginal en el área dorsal de la oreja.

El pelo se corta, se rasura o se le aplica un agente depilatorio.

⁵ ZAPATA, Wildeman y FAJARDO, Holtman, Manual de química Sanguínea veterinaria. 2p Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/51164083/Manual-de-quimica-sanguinea-vete>.

⁶ MAXINE M. BENJAMIN, outline of Veterinary Clinical Pathology, 3rd ed 1991. 9p.

⁷ Ibid., 9p.

Se frota la piel con alcohol o éter. Se coloca el dedo índice de la mano izquierda al momento de aplicar la navaja filosa, un estilete o una jeringa. Con esto se proporciona un apoyo y se asegura una incisión solamente a través de la piel de la vena y no a través del cartílago subyacente, por que debe evitarse hacer cortes en las orejas y que sangren los dedos.

Cuando se usa una jeringa en un animal grande como el conejo deberá usarse una aspiración suave para evitar que la vena se colapse.⁸

Dedo del pie o uña: se puede usar en perros pequeños, cachorros, conejillos de indias y pequeños animales silvestres.

Al cortar una uña en el conejillo de indias se iniciara inmediatamente un goteo uniforme. Este disminuye gradualmente después de 20-40 gotas pero se puede obtener con facilidad hasta 80 gotas (4ml). Primero se corta el pelo por que la presencia aunque sea de unos cuantos pelos acelera la coagulación. Después de desinfectar, se corta el lecho capilar. En la rata o ratón anestesiados se puede extirpar un dedo con tijeras o pinzas para obtener la sangre de ese sitio.⁹

Cola: se puede usar en el cerdo, oveja, bovino, rata, ratón, hámster y peces. La vena coccígea en la porción ventral de la cola del bovino se hace visible cuando se flexiona la cola hacia arriba. El sitio de la venipunción es aproximadamente a 10 cm del perineo. Este sitio, así como los cuernos, es deseable cuando se obtiene sangre del ganado de exposición ya que se evitan daños.

Las venas de las ratas y ratones se pueden ver por medio de luz brillante o por medio de trans-iluminación y se puede dilatar para facilitar la maniobra de masaje con xilol o sumergiendo la cola en agua caliente.

Amputación: el uso más común en la rata y el ratón. La amputación de un pedazo de la cola o una incisión transversa con una navaja filosa producirá el goteo de sangre.

El masaje de la cola desde el cuerpo hacia la punta puede proporcionar como 3ml de sangre de una rata. Se puede obtener mayores cantidades si se pone la cola en agua caliente a 45 °C, durante un minuto.

Cuando el roedor está acostumbrado a que se lo maneje, se puede utilizar el método de sostener el animal con una mano. Si no se coloca en

⁸ Ibid., 10p.

⁹ Ibid., 10p.

un tubo de tamaño adecuado con la cola colgando a través de la abertura.¹⁰

Corazón: Se puede utilizar en cualquier animal, pez, reptil o pájaro.¹¹

Vasos femorales, safenos, tíbiales: se usan en perro, gatos, primates mamíferos pequeños y ratas.

En los gatos la vena femoral se localiza con facilidad.

Se pueden obtener mayores cantidades de sangre de los monos en la vena femoral a lo largo del aspecto medial de la pierna entre la rodilla y el abdomen.¹²

Vena mamaria: La vena se encuentra en el borde anterior de la glándula mamaria, aproximadamente de 5-7 cm lateral a la línea alba y corre hacia delante, desviándose lateralmente y pasando por el foramen de la pared abdominal, posterior a las costillas (Bovinos).

La venipunción se hace de una manera similar a la de la extracción de sangre yugular; sin embargo, es más difícil lograr la distensión de la vena mamaria.¹³

Vena cava anterior: Se inserta una aguja en la parte inmediatamente anterior y ligeramente lateral al cartílago cariniforme y en la línea del cartílago a la base de la oreja (Cerdo). Se dirige la aguja hacia arriba, ligeramente hacia atrás y medialmente.

Plexo nervioso retroorbital: se usa en ratas, ratones, conejillos de indias y hámster. El plexo se comunica con los vasos sanguíneos del cerebro y sea reportado que esta técnica es menos traumática que ningún otro procedimiento.

Se puede repetir la veces que sea necesario y es el mejor método para obtener grandes cantidades de sangre (máximo de 0.5-1ml) en el ratón.

¹⁰ Ibid., 10p.

¹¹ Ibid., 10p.

¹² Ibíd., 10p.

¹³ Ibíd., 11p..

Vena alar o de la cresta: Después de desplumar la región axilar se ve la región alar, que corre por debajo del músculo pectoral y luego a lo largo de la superficie ventral del humero (aves).¹⁴

2. El tipo de tubo: (prueba de ELISA).

Se utiliza en tubo de tapa roja y que se usa para pruebas que requieran de sangre coagulada. Ya que la mayoría de los análisis químicos se prefiere el suero al plasma por las posibilidades de las interferencias en la pruebas con los diferentes anticoagulantes. Sin embargo, el plasma sea separado con cuidado de la masa celular tendrá menos hemoglobina que el suero; donde los anticoagulantes no interfieren, el plasma es el espécimen de elección.¹⁵

Para sangre coagulada: el tamaño depende de la cantidad de sangre necesaria. El recipiente debe estar químicamente limpio y seco.

Para sangre total o plasma: se recomienda frascos de vidrio con tapones de hule o polietileno, los cuales pueden encontrarse en diferentes tamaños, de 2 a 50 ml, ya sea solos o con una variedad de anticoagulantes.

Uso del vacutainer: Insertar el tubo en el soporte de arriba de la aguja con el extremo conductor del tapón llegue a la línea de soporte. El tapón y el soporte se retraerán. Hay que dejarlos en esta posición ya que la aguja se incrustará en el tapón del diagrama para mantener el vacío.

Realizar la punción venosa en forma acostumbrada. Cuando la aguja este por debajo de la piel se colocan los dos dedos primeros por debajo del borde de soporte. El pulgar de la misma mano se pone en el extremo del tubo. Se jala con los dedos y se empuja con el pulgar hasta que el tubo quede por encima de la aguja y hasta la parte superior del soporte.

Si la aguja se encuentra en la vena, la sangre fluirá hacia el tubo. Si no entra sangre al tubo, hay que buscar la vena hasta que aparezca el flujo

¹⁴ Ibíd., 11p..

¹⁵ Ibíd., 8p.

de sangre. Mientras el tubo se está llenando se retira la presión de la vena o el torniquete.

Cuando no se puede localizar la vena y es necesario volver a puncionar la piel, se puede quitar el tubo de vacutainer de la aguja antes de extraer la aguja. Todo lo que se necesita para intentar una segunda punción en la vena con el mismo tubo es volver a colocar la aguja extraída del diafragma.¹⁶

3. Cantidad de sangre necesaria.

La cantidad de sangre necesaria depende de la prueba o pruebas que se soliciten y de los métodos que se utilicen en laboratorio donde se realizan las pruebas.

Para pruebas de química clínica automatizados, es necesario tener un mínimo de 2.5ml de suero.

Para ayudar en el diagnóstico de una enfermedad, la cantidad máxima que se toma debe ser la más pequeña necesaria para las pruebas que se van a realizar, sin escatimar.

Por regla general se considera seguro tomar aproximadamente 0.5 ml de sangre/ Kg de peso corporal en todas las especies.¹⁷

4. Transporte de la muestra.

El cuidado de la muestra sanguínea hasta que es analizada en el laboratorio es importante, debe ser correctamente rotulada y conservada para las pruebas bioquímicas.

Para el transporte y conservación del suero se debe esperar la retracción del coágulo, en nuestro medio, la sangre de los animales se coagula entre 20-30 minutos, sin embargo lo mas recomendado es esperar 1-2 horas a temperatura ambiente, cuanto más tiempo se deje para que esta retracción tenga lugar, mayor cantidad de suero se obtendrá, aunque la cantidad de suero no será nunca mayor de un 40% del volumen original de sangre. Después de la retracción del coágulo la muestra debe ser refrigerada a 4°C para su transporte, colocándola en hielo picado o en una caja fría.

¹⁶ *Ibíd.*, 11p.

¹⁷ MAXINE. *Op. cit.*, p. 17.

Para el transporte y conservación del plasma no hay necesidad de esperar que la sangre se sedimente, después de obtenida debe ser refrigerada para su envío al laboratorio en nevera portátil con hielo seco o picado.

El suero y el plasma no deben ser conservados más de 6 horas en refrigeración sin ser separados de los demás componentes sanguíneos, porque esto trae como consecuencia alteración en los diferentes metabolitos de la sangre a determinar y por lo tanto errores en los resultados del laboratorio.¹⁸

5. Manejo de la Muestra.

Suero. El tubo que contiene sangre sin anticoagulante se debe centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células del suero. Luego con una pipeta Pasteur se debe separar el suero o sobrenadante y transferir a un tubo de almacenamiento para la realización de las diferentes pruebas.¹⁹

Conservación de la muestra. Las muestras de suero o plasma previamente separadas de las células, pueden conservarse a temperatura ambiente (20-30°C) durante un día sin que se deterioren, en la parte refrigerada a (4°C) durante 4 días; en el congelador (-15 a -20°C) durante una semana o indefinidamente.

Particularmente, debe evitarse hacer congelaciones y descongelaciones repetidas para que las enzimas no pierdan su actividad inicial. Las muestras congeladas deben descongelarse lentamente hasta la temperatura ambiente. De esta manera se conservaran mejor los metabolitos, se obtendrán resultados más acertados y diagnósticos más exactos.²⁰

¹⁸ ZAPATA y FAJARDO. Op. Cit., p 7,8.

¹⁹ *Ibíd.*, 8p.

²⁰ *Ibíd.*, 8p.

TOMA DE MUESTRAS DE LECHE.

1. LECHE DE TANQUE

El envase para recolección de la muestra debe ser resistente a la ruptura, con cierre hermético. Esterilizado y conservado en su envoltorio original para aseguramiento su esterilidad.

Cucharón o bastón saca muestras: Debe estar siempre limpio y seco (lavarlo con detergente alcalino todos los días, y ácido 1 o 2 veces por semana). Antes de introducirlo en la leche se “flamea” usando alcohol puro (96°) y prendiendo fuego. Una vez consumido el alcohol y apagado la llama está listo para usar.

Materiales para la conservación: Conservadora de poliestireno expandido (icopor) o material similar, limpias y con cierre hermético.

La muestra podrá ser conservada utilizando productos químicos apropiados, autorizados a los fines de los análisis que se realizarán sobre dicha muestra, y refrigeración.

Deberá realizarse con un marcador indeleble (al solvente), preferentemente sobre una etiqueta para su identificación, la cual deberá ser unívoca, rastreable respecto de otros registros y legible.

Procedimiento: Si el agitador estuvo girando durante todo el tiempo que duró el ordeño, se puede tomar la muestra inmediatamente; en el caso en que el agitador no haya estado funcionando, o la muestra sea tomada lejos de la finalización del mismo, se debe poner en marcha el agitador durante 5 minutos para tanques de menos de 5500 lts. ó 10 minutos para tanques de más de 5500 lts.. Si no existiera agitador mecánico se debe homogeneizar con el agitador manual del tambo.

- Abrir la tapa del tanque.
- Abrir el envase y sostener la tapa con la misma mano.
- Introducir el cucharón dos veces en la masa de leche volcando la leche dentro del tanque.
- Tomar la muestra introduciendo la saca muestras como mínimo 15 a 20 cm por debajo del nivel de leche del tanque.
- Volcar el contenido de la leche dentro del envase evitando derrames.

- Completar $\frac{3}{4}$ partes del envase.
- Cerrar herméticamente.²¹

2. LECHE DE CUARTOS.

Materiales:

Tubos esterilizados con cierre hermético.

Algodón y alcohol de 70°, puede prepararse con la siguiente proporción: 300 ml de alcohol de 96° + 100 ml de agua destilada.

Gradilla o frascos de boca ancha para ubicar los tubos.

Conservadora de icopor limpia, seca y con cierre hermético.

Refrigerantes.

Marcador indeleble(al solvente).

Procedimiento: El pezón a muestrear debe estar limpio y seco. Con una torunda de algodón embebida en alcohol de 70° frotar la punta del pezón (Sobre todo el esfínter). Luego ordeñar algunos chorros al piso y después dentro del tubo. Con un marcador indeleble anotar el número de la vaca y el cuarto sobre el tubo.

Si se toma una muestra compuesta de los 4 cuartos, recoger la leche de todos los cuartos en el mismo tubo. Colocar la gradilla con los tubos en la conservadora con abundante cantidad de refrigerantes, y remitir al laboratorio dentro de las 24 hs.

Las muestras pueden ser congeladas por un período no mayor a cuatro semanas. En tal caso consignar en el envío que las muestras han sido congeladas.²²

Leche individual o conjunto de muestras de leche hasta de 50 muestras/animales, se requiere de 100 μ l de leche desnatada para cada pocillo/muestra. Se recomienda centrifugar las muestras de leche durante 15 minutos a 2000 x g para retirar la capa de grasa (lípidos), o dejar

²¹ GOYENA. PEDRO, Indicaciones para la correcta toma y remisión de muestras leche de tanque, seriadas y en cuartos. Disponible en: <http://www.lactodiagnosticosur.com.ar/instructivos/TOMA%20Y%20REMISION%20DE%20MUESTRAS%20con%20logo.pdf>.

²² Ibíd., 2,3 p.

reposar las muestras de leche hasta que se forme una capa de grasa en la superficie. Pipetear debajo de la capa de grasa.²³

RECOLECCION DE MUESTRA DE HECES.

Es indispensable la aplicación de medidas higiénicas estrictas como medida de protección en la toma de muestras de heces, así como seguir las indicaciones específicas para cada tipo de animal, utilizando recipientes limpios o estériles para la recolección de la muestra.

En las especies de talla grande es más práctico e higiénico obtener muestras directamente del recto del animal, con un guante de plástico. Una vez obtenida una muestra adecuada, el guante es reversado hacia adentro, sirviendo de esta forma como recipiente de recolección, una vez colectado se sella, se identifica y se envía refrigerada al laboratorio. En los animales pequeños, las muestras fecales son obtenidas por medio del termómetro o una varilla de vidrio, aunque esta pequeña cantidad será apenas suficiente para un examen directo. En caso de no ser posible la recolección directa se procederá a tomarla muestra directamente del recto, se cuidará que la defecación ocurra sobre un piso previamente lavado. En este caso la muestra se recogerá con guante plástico, espátula de madera, tomando solo la capa superior que no entró en contacto con el suelo.²⁴

TOMA DE MUESTRA DE ORINA.

El análisis de orina es uno de los procedimientos de laboratorio más comunes aplicados a la práctica veterinaria, es de gran ayuda para el diagnóstico diferencial tanto de padecimientos generalizados como del aparato genitourinario.

Para su recolección es necesario emplear recipientes limpios, preferentemente estériles. La muestra se recogerá durante la micción o por sondeo, siendo este último más adecuado por estar libre de detritus uretral o vaginal. Es difícil cateterizar a un perro más de una o dos veces

²³ ELISA SVANOVIR®, Manual de Kits. BLV gp51: N° artículos 10-2351-02 y 10-2351-10. Disponible en: customer.servive@SVANOVA.com.

²⁴ PALMA. Op. cit., p. 4.

al día puesto que la reacción tisular al traumatismo, causa un estrechamiento del lumen uretral a través del oспенis.

Orina, materia fecal; sujeta a diluciones y procesamiento propios de cada prueba y kit.²⁵

f. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En el principio intervienen muchas configuraciones posibles en la prueba ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA. Los siguientes son los métodos principales base para todas las pruebas ELISA:

Para anticuerpos marcados:

- A. ELISA Directo
- B. ELISA Indirecto
- C. ELISA sándwich (directo o indirecto).²⁶

Los tres sistemas se pueden utilizar para formar la base de un grupo de ensayos llamada competencia o la inhibición de ELISA:

Para antígeno marcado:

- A. ELISA competitivo.

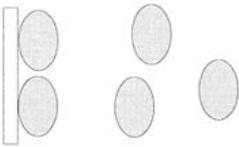
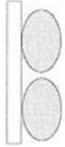
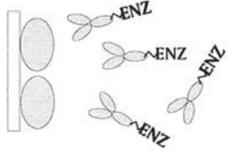
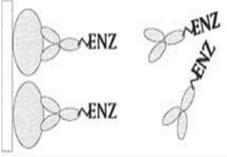
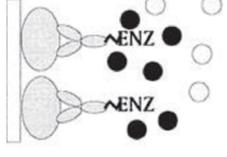
²⁵ *Ibíd.*, 5 p.

²⁶ CROWTHER R. JOHN, *The ELISA guidebook*. 2da edición. Vienna: Austria 2009. P.25.

A. ELISA DIRECTA

Puede ser considerada como la forma más simple de ELISA.

Tabla 1 Procedimiento ELISA Directa

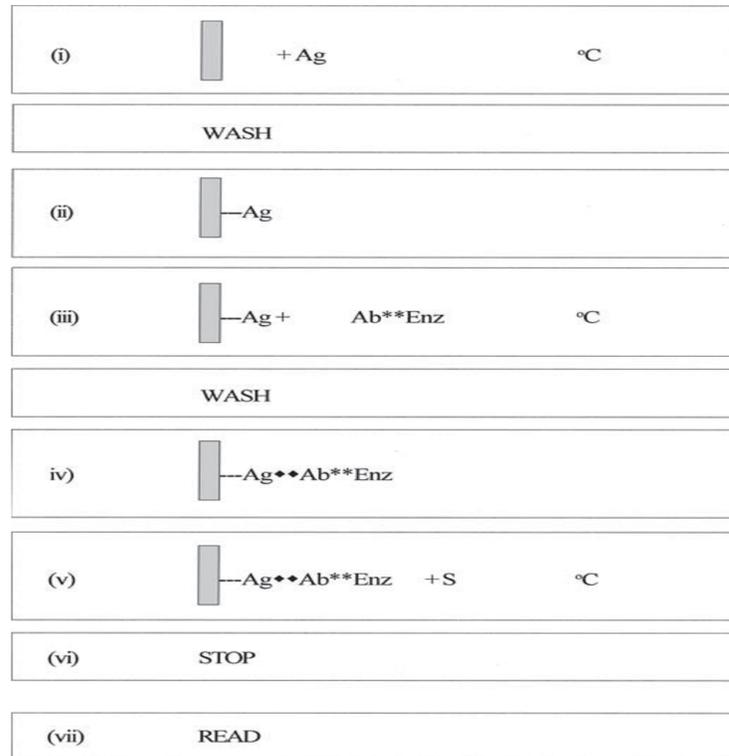
Procedimiento	Ilustración
1. Se añade el antígeno a la fase sólida y se absorbe pasivamente en incubación.	
2. Después de la incubación, cualquier antígeno no unido se elimina por lavado dejando la fase sólida recubierta.	
3. Los anticuerpos específicos para el antígeno se han marcado con una enzima (conjugado) se agregan y se incuban.	
4. El conjugado se une con el antígeno en fase sólida. Cualquier conjugado no unido (libre) se elimina por lavado.	
5. Una solución de sustrato / cromóforo se añade y la enzima cataliza la reacción para dar un producto de color.	

Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009. p.26.

ELISA directo. El antígeno se une a la fase sólida mediante absorción pasiva. Después del lavado, es marcado con la enzima y se añaden anticuerpos. Después de un período de incubación y el lavado, al

procedimiento se añade el sustrato y permitiendo así el desarrollo de color.

Figura 1. ELISA DIRECTA



Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009.

El antígeno se diluye en un tampón (estadio I), comúnmente un pH alto (9,6) carbonato o bicarbonato de amortiguación o pH neutral; tampón de fosfato en solución salina (PBS). La clave es que el tampón no contenga otras proteínas que podrían competir con el antígeno diana para su unión a la fase sólida en el plástico. Los antígenos son principalmente proteínas en su naturaleza y se adjuntará a la forma pasiva al plástico durante un período de incubación. La temperatura y el tiempo de incubación no son tan importantes, pero la normalización de las condiciones es de vital importancia, y el uso de las incubadoras a 37 ° C es la óptima (ya que está ampliamente disponible en los laboratorios). Después de la incubación, cualquier antígeno en exceso se elimina, por un paso de lavado simple (fase II), llenando y vaciando el pozos,

utilizando una solución tampón neutro (por ejemplo, PBS). Los anticuerpos conjugados con la enzima, se añade (fase III), y se dirigen específicamente contra sitios antigénicos en la fase obligada del sólido y reactivo. Los anticuerpos conjugados se diluyen en un tampón, el cual contiene una sustancia que inhibe la absorción pasiva de proteínas, pero que aún permite la unión inmunológica. En la incubación, los anticuerpos se unen al antígeno. Una vez más, un paso simple lavado se utiliza para eliminar anticuerpos no unidos (estadio IV). V etapa consiste en la adición de un sustrato adecuado o sustrato / cromógeno combinación de la enzima en particular unido a los anticuerpos. El objetivo es permitir el desarrollo de una reacción de color a través de la catálisis enzimática. La reacción permite el progreso por un período definido, después del cual la reacción se detiene (fase VI) mediante la alteración del pH del sistema, o mediante la adición de un reactivo de la inhibición. Por último, el color se cuantifica mediante la uso de un espectrofotómetro de lectura (etapa vii) en el momento adecuado longitud de onda para el color producido.²⁷

B. ELISA INDIRECTA

Las etapas i y ii son similares a los del sistema directo. Fase III consiste en la adición de la marcación de detección de anticuerpos, que se diluyen en un tampón para impedir la adhesión no específica de las proteínas en el suero de la fase sólida (el amortiguador de bloqueo). Esto es seguido por la incubación y lavado del exceso (no ligado) a los anticuerpos, para alcanzar determinados vinculantes (estadio IV). Etapa V es la adición del conjugado (marcado con la enzima), especies de anticuerpos, diluido en tampón de bloqueo, una vez más seguido de la incubación y el lavado.

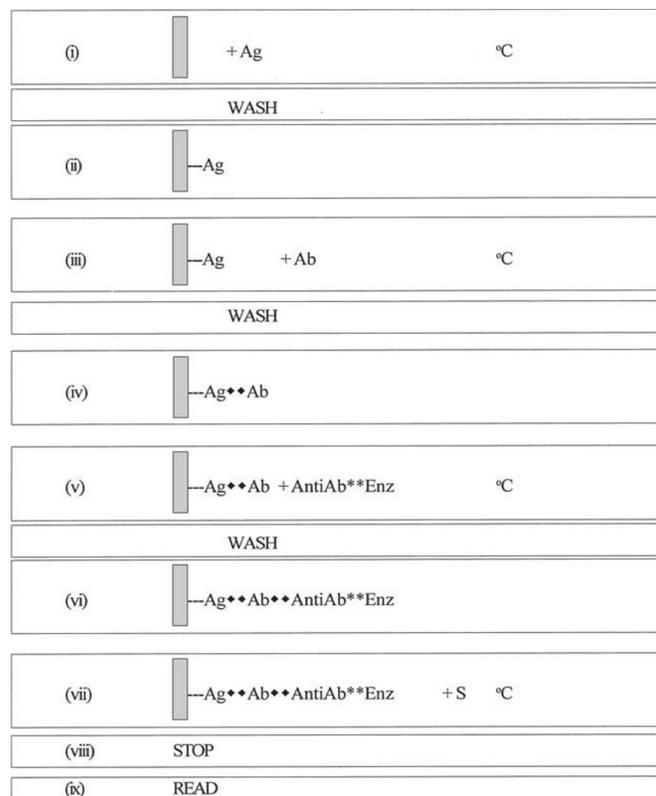
Después de lograr la unión del conjugado (fase VI). Se añade el Sustrato / cromóforo al conjugado unido (fase VII) y el color se desarrolla, luego se realiza la parada (etapa viii) y se lee (etapa ix) en un espectrofotómetro.²⁸ El sistema indirecto es similar al sistema ELISA directa en que el antígeno está conectado directamente a la fase sólida y es seguida por adición de anticuerpos (detección de anticuerpos). Sin embargo, estos añadidos anticuerpos no están marcados con la enzima, pero se están conduciendo por los anticuerpos relacionados con la enzima. Estos

²⁷ Ibid., p. 28.

²⁸ Ibid., p. 28.

anticuerpos son producidos contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se detectan y se producen los anticuerpos, estos reciben el nombre de conjugados de anti-especie. Por lo tanto, si la detección de anticuerpos se produce en conejos, la enzima marcada con anticuerpos tendría que ser anti-conejo Igs en la naturaleza. Esto permite una gran flexibilidad en el uso de especies anti-conjugados en que diferentes especificidades de conjugado.

Figura 2. ELISA Indirecta.

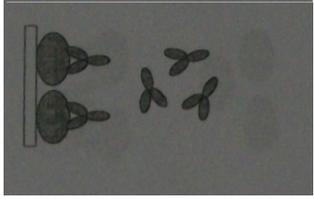
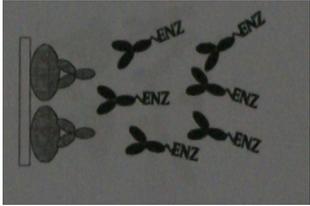


Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009. p.29

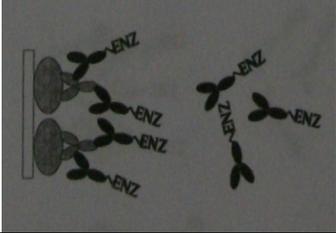
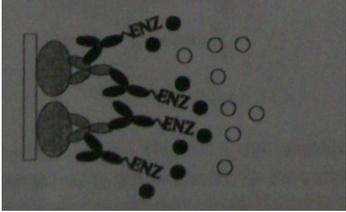
Se puede utilizar en particular para detectar la unión de inmunoglobulina en el ensayo, y hay literalmente miles de conjugados disponibles comercialmente. Por ejemplo, el conjugado anti-especie podría ser anti-IgM, anti-IgG 1, IgG anti-2, y así sucesivamente. El sistema indirecto ofrece la ventaja de que cualquier número de antisueros pueden ser examinadas por la unión a un antígeno determinado, utilizando un solo

conjugado anti-especie. Estos sistemas han sido fuertemente explotados en aplicaciones de diagnóstico, sobre todo cuando se examina (cribado) un gran número de muestras. Uno de los problemas que estos sistemas tienen es el mayor o menor grado de unión no específica en sueros individuales. Esto tiende a aumentar la dispersión (variabilidad) en los resultados del ensayo y, por tanto, aumenta la necesidad de procesar muchos sueros para evaluar la confianza.²⁹

Tabla 2. ELISA Indirecta.

Procedimiento	Ilustración
<p>1- Antígeno absorbido de forma pasiva a la fase sólida mediante la incubación.</p>	
<p>2- Los anticuerpos se agregan y se incubaron con el antígeno en fase sólida. Los que son específicos se unen al antígeno. El exceso de anticuerpos o componentes que no son vinculantes son lavados después de la fase de incubación.</p>	
<p>3- Los anticuerpos marcados con la enzima (conjugado) conducidos, contra la especie en la que los anticuerpos originales fueron producidos (anti-especie).</p>	

²⁹ Ibid., p. 29.

<p>4- Estos se unen a los anticuerpos que se unen al antígeno. El exceso de conjugado se elimina por lavado después de un período de incubación.</p>	
<p>5- Sustrato / cromóforo se añade color y se desarrolla como resultado de la enzima presente. Después de un período de incubación, el desarrollo del color se detiene y se lee por espectrofotometría.</p>	

Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009. p.30.

ELISA indirecto. Los anticuerpos de una especie en particular reaccionar con el antígeno unido a la fase sólida. Cualquier límite en los anticuerpos se detecta mediante la adición de un antisuero anti-especie marcado con la enzima. Esto es ampliamente utilizado en diagnóstico.

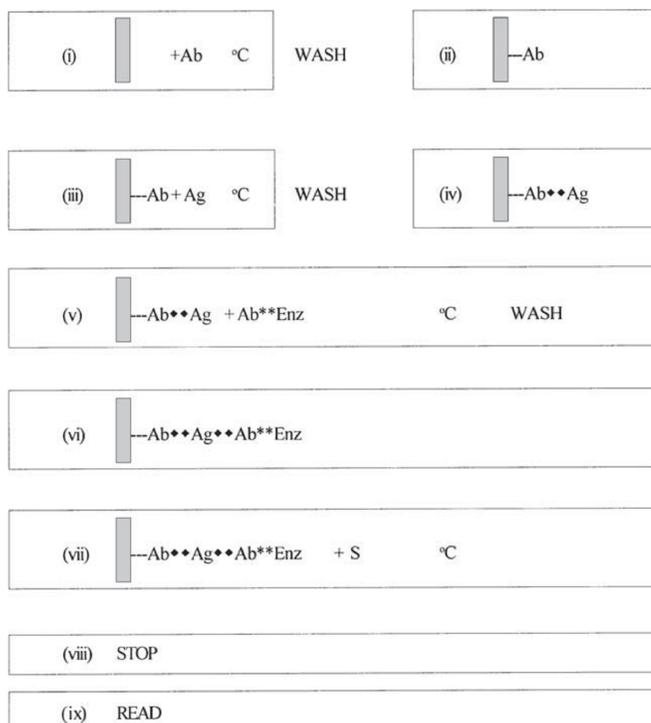
B. ELISA sándwich

Se puede dividir en dos sistemas, que han sido nombrado como ELISA sándwich directa y ELISA sándwich indirecta.³⁰

1. ELISA sándwich directa. Implica la unión pasiva de anticuerpos a la fase sólida (estadios I y II). Esta es una (captura de anticuerpos), entonces se unen al antígeno (s) que se agregan en la etapa

³⁰ Ibid., p. 30.

Figure 3. ELISA Sándwich Directa

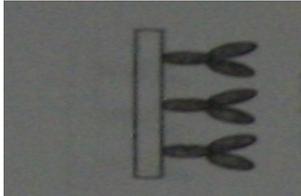
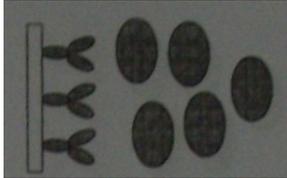
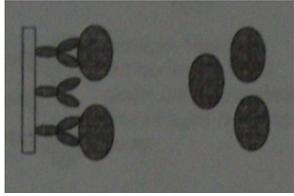
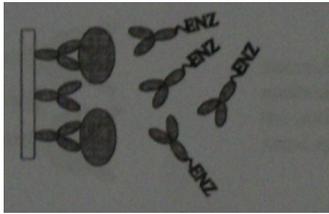


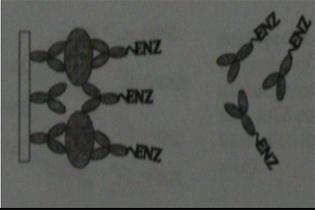
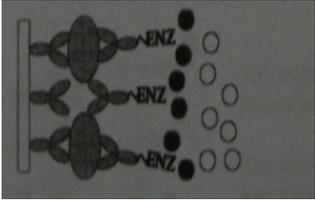
Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009.p. 31.

iii. El antígeno (s) se diluyen en un tampón de bloqueo para evitar el apego inespecífico a la fase sólida. En este caso, los componentes del tampón de bloqueo no deben contener antígenos que podrían unirse a los anticuerpos de captura. Después de la incubación y el lavado, un anticuerpo complejo se une con el antígeno en la fase sólida (etapa IV). El antígeno capturado (a veces conocido como atrapado) es detectado por la suma y la incubación de la enzima marcada y de los anticuerpos específicos en el tampón de bloqueo (fase V). Por lo tanto, se trata de conjugar la unión directa con los objetivos antigénicos en la captura antigénica. Este segundo anticuerpo puede ser la misma que la utilizada para la captura, o ser diferentes en términos de origen animal específico o especies en las que se ha producido. Después de la incubación y el lavado (fase VI), la enzima ligada es desarrollada por la adición de sustrato / cromógeno (fase VII), luego se detuvo (etapa viii), y finalmente lee mediante un espectrofotómetro (etapa ix).³¹

³¹ Ibid., p. 31.

Tabla 3 ELISA Sándwich Directa.

Procedimiento	Ilustración
<p>1- Anticuerpos unidos pasivamente a fase sólida mediante la incubación en tampón.</p>	
<p>2- Los anticuerpos libres se lavan y se añade el antígeno.</p>	
<p>3- El antígeno es capturado por los anticuerpos de recubrimiento durante la incubación. El antígeno no unido se eliminan por lavado.</p>	
<p>4- Los anticuerpos conjugados son conducidos contra el antígeno. Estos anticuerpos pueden ser de la misma preparación que se utiliza en la fase sólida o de una fuente diferente (especies).</p>	
<p>5 - La unión del conjugado durante la incubación completa el "sándwich". El conjugado libre se elimina por lavado.</p>	

	
<p>6- Se añade el cromóforo / sustrato y el color se desarrolla por un tiempo definido. La reacción de color se detiene y es cuantificado en un espectrofotómetro.</p>	

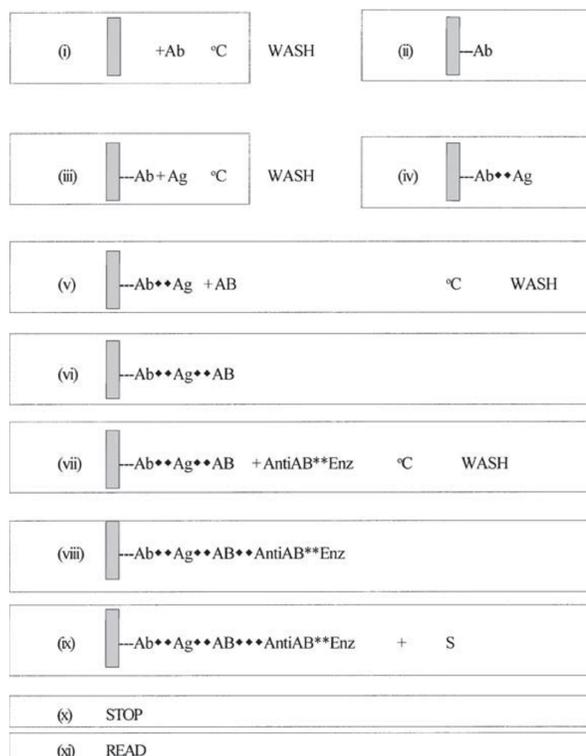
Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009. P. 32.

ELISA sándwich Directa. Este sistema explota a los anticuerpos unidos a una fase sólida a la captura de antígeno. El antígeno es detectado utilizando suero específico para el antígeno. El anticuerpo está marcado con enzima para su detección. El anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección puede ser el mismo suero o de diferentes animales de la misma especie o de diferentes las especies. El antígeno debe tener al menos dos sitios antígenicos diferentes.

2- ELISA sándwich Indirecto

Las fases I-IV son muy similares a sándwich directo.

Figura 4. ELISA Sándwich Indirecta



Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009. P. 33.

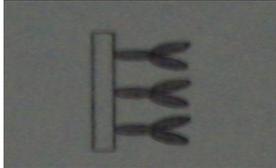
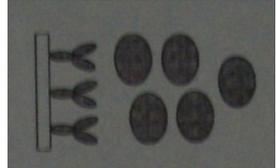
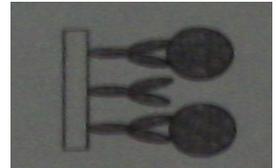
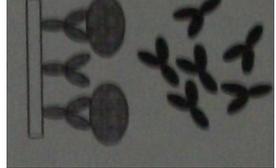
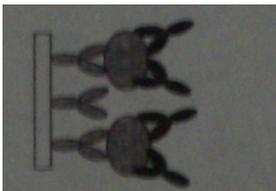
Por lo tanto, los anticuerpos son pasivamente unidos a la fase sólida y el antígeno (s) es capturado. Sin embargo, la etapa v implica la adición un detector de anticuerpos. En este caso, los anticuerpos no están marcados con la enzima. Después de la incubación y el lavado (fase VI), la detección de anticuerpos se realiza mediante la adición y la incubación con un conjugado enzimático anti-especies (fase VII). El conjugado unido luego es procesado como se describe en los otros sistemas (etapas xiii-ix).³²

La ventaja de este ensayo es que cualquier número de diferentes fuentes de anticuerpos (muestras) se pueden añadir al retrato del antígeno, una condición en la que la especie en que se ha producido no sea el mismo que el anticuerpo de captura. Más específicamente, la enzima conjugada anti-especie de anticuerpo no reacciona con los anticuerpos que utiliza para capturar el antígeno. Es posible utilizar la misma especie de anticuerpos si las técnicas de inmunoquímica se

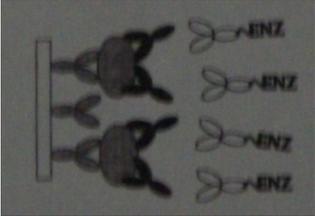
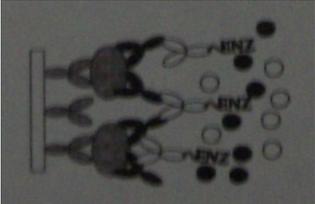
³² Ibid., p. 34.

utilizan para seleccionar y producir formas particulares de anticuerpos y con la atención y la especificidad del conjugado de enzima utilizado.³³

Tabla 4. ELISA Sándwich indirecta

Procedimiento	Ilustración
1- Los anticuerpos unidos pasivamente a fase sólida mediante la incubación en tampón.	
2- Los anticuerpos libres son lavados y luego añade el antígeno.	
3- El antígeno se une a los anticuerpos en fase sólida durante la incubación, el antígeno libre es arrastrado.	
4- Los anticuerpos contra el antígeno se añaden, se trata de una especie diferente de anticuerpos en fase sólida.	
5- El segundo anticuerpo se une a la incubación, los anticuerpos libres son lavados. Esto completa "sándwich" del anticuerpo. Esto no puede ser	

³³ Ibid., p. 34.

de una misma especie, como anticuerpos de recubrimiento.	
6- Al conjugado anti-especie se añade el segundo anticuerpo que se preparó. Esto no puede reaccionar con los anticuerpos en fase sólida. Después de la incubación del conjugado no unido se elimina por lavado.	
7- El sustrato / cromóforo es añadido y el desarrollo del color es permitido en incubación. La reacción se detiene y se cuantificarán mediante un espectrofotómetro.	
Fuente: CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009.	

Sándwich ELISA indirecto. El antígeno es capturado por un anticuerpo en fase sólida. El antígeno se detecta con el uso de anticuerpos de otra especie. Esto a su vez está requerido por un conjugado anti-especie. De este modo, la especie de suero para el recubrimiento y la detección de anticuerpos deben ser diferentes; el conjugado anti-especie no puede reaccionar con los anticuerpos de recubrimiento.³⁴

ANTIGENO MARCADO

1. ELISA Competitiva.

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.

³⁴ Ibid., p. 35.

2. Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente, se añade únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
3. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
4. Lectura colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra.³⁵

g. PASOS GENERALES DE LA PRUEBA ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo

³⁵ X FUENTES ARDERIU, Bioquímica Clínica y patológica molecular. Vol. 1, editorial Reverte, 1998. P.352.

7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo del color³⁶

h. MONTAJE DEL PROCEDIMIENTO (KIT DE ELISA, SVANOVIR®).

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL KIT Y LOS REACTIVOS

Conservar el kit y los reactivos de 2-8 °C.

Figura 5 Almacenamiento de los reactivos, Kit SVANOVIR

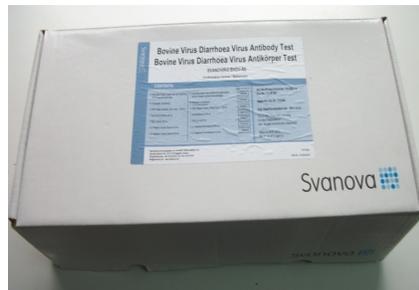


Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de La Universidad de Nariño

Antes de su uso, debe dejar que los reactivos alcancen una temperatura ambiente de 18 a 25 °C.

³⁶ TORTORA J. Gerard, FUNKE R. Bredell, CASE I. Christine. Introducción a la microbiología, ed. Panamericana, 2007, p. 543.

Figure 6. Kit SVANOVIR®



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de La Universidad de Nariño

Figure 7. Kit SVANOVIR®



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de La Universidad de Nariño

No contaminar o mezclar los componentes del kit, todos los componentes del kit son estables hasta fecha de caducidad indicada en la etiqueta, mantener los frascos bien cerrados y protegidos de la luz. En algunos casos la solución frenadora contiene ácido sulfúrico que es corrosivo.³⁷

Figura 8. Microplacas (antígeno Inmovilizado en los pocillos).



Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

³⁷ ELISA SVANOVIR®. Op. Cit. P. 13.

Figura 9. Microplacas 8/12 pocillos.



Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

MATERIALES NECESARIOS

1. Pipetas de precisión (de 4-200ul).
2. Puntas de pipetas desechables.
3. Agua destilada, deionizada o cualquier otra agua altamente purificada.
4. Botella para enjuague.
5. Recipiente de 1-2 litros para PBS- Tween.
6. Fotómetro de microplacas, filtro de 450nm

REACTIVOS

1. **HRP** (Peróxidasa de rábano picante), el conjugado forma un complejo con los anticuerpos buscados.

Figure 10 Reactivo HRP (Peróxidasa de rábano picante).

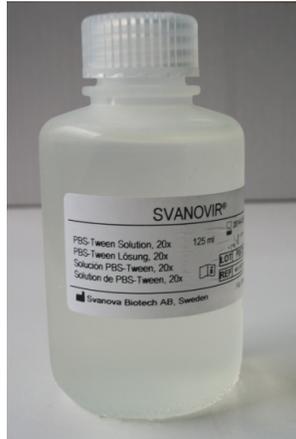


Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

2. **Solución de Tween:** se diluye la solución de PBS-Tween 20 * en una proporción de 1/20 en agua destilada. Preparar 500ml por placa de

añadiendo 25 ml de solución de PBS-Tween a 475ml de agua destilada y mezclar bien.

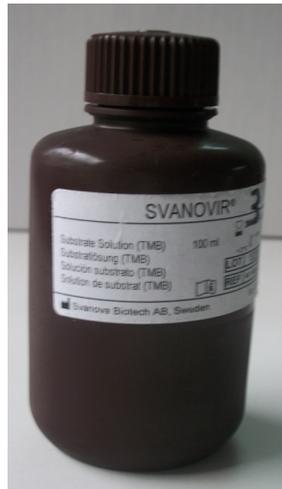
Figure 11 Solución de PBS- Tween 20.



Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

3. Marcador enzimático. Enzima sustrato tampón

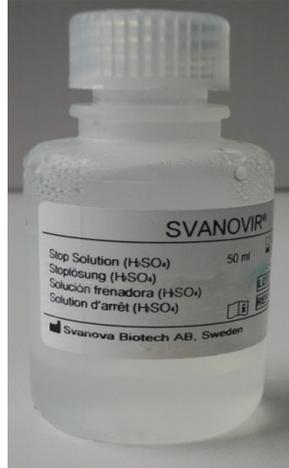
Figure 12 Solución sustrato (TMB).



Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

4. Solución de Frenado:

Figure 13. Solución de Frenado (H₂SO₄).



Fuente: Kit SVANOVIR® Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño

MONTAJE DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento de este kit se basa en un ELISA indirecto en donde las muestras se exponen a un antígeno inactivado inmovilizado en pocillos de microplacas/tiras. Si las muestras contienen anticuerpos buscados, estos reaccionarán con el antígeno inmovilizado en la microplaca.³⁸

PASOS Kit de ELISA, SVANOVIR®.

1. Antes de su uso, dejar que los reactivos alcancen una temperatura ambiente de 18-25 °C. marcar cada tira con un número.
2. Añadir las muestras. Los sueros controles negativos y positivos incluidos el kit, se utilizan tanto para muestra de suero como de leche.

Muestras de suero utilizando 4 µl de la muestra.

- a. Agregar 100µl de solución PBS-Tween a cada pocillo que va a utilizarse para las muestras de suero y suero controles.

³⁸ ELISA SVANOVIR®, Manual de Kits. BLV gp51: N° artículos 10-2351-02 y 10-2351-10. P. 12. Disponible en: customer.servive@SVANOVA.com.

- b. Agregar 4µl de suero control positivo (reactivo A) y 4µl de suero control negativo (reactivo B), respectivamente, a los pocillos apropiados sensibilizados con antígenos buscados y al pocillo apropiado sensibilizados con antígeno buscado y a los pocillos correspondientes con antígeno control. Para su confirmación se recomienda correr controles en duplicado.
- c. Agregar 4 µl de la muestra en el suero al pocillo apropiado sensibilizado con el antígeno buscado y al pocillo correspondiente con el antígeno control. Para confirmación se recomienda correr muestras en duplicado.³⁹

Muestras de suero utilizando 10µl de la muestra.

- a. Agregar 90µl de la solución de PBS-Tween a cada pocillo que va a utilizarse para las muestras de suero y suero controles.
- b. Agregar 10 µl de suero control positivo (reactivo A) y 10µl de suero control negativo(reactivo B)respectivamente, a los pocillos apropiados sensibilizados con el antígeno buscado y a los pocillos correspondientes con antígeno control. Para confirmación se recomienda correr controles en duplicado.
- c. Agregar 10µl de la muestra en el suero al pocillo apropiado sensibilizado con el antígeno buscado y al pocillo correspondiente con antígeno control. Para confirmación se recomienda correr muestras en duplicado.

Muestras de leche.

- a. Ver muestras de suero utilizando 4µl de la muestra (puntos A y B).
- b. Para procedimiento alternativo: Pre-diluir el suero control positivo (reactivo A) y suero control negativo (reactivo B) 1:25 en solución tampón PBS Tween (por ejemplo 20µl en 500µl de solución de PBS Tween).agregar 100µl del control de suero positivo pre-diluido (reactivo A) y suero control negativo (reactivo B) respectivamente a los pocillos apropiados. Para confirmación se recomienda correr los controles de suero en duplicado.

³⁹ Ibid., p. 14.

3. Agitar la placa bien pero cuidadosamente. Sellar la microplaca/tiras e incubar a 37 °C por una hora o durante la noche (16-20 horas) a 4-8 °C.⁴⁰

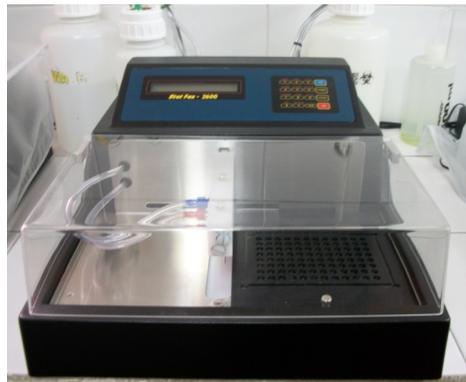
Figure 14 STAT FAX 2200-INCUBADOR/SHAKER



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño.

4. Enjuagar las placas/tiras 3 veces con solución PBS Tween; en cada ciclo de enjuague, rellenar los pocillos, vaciar la placa y golpearla sobre una superficie cubierta con un material absorbente para eliminar todo resto de líquido.⁴¹

Figure 15. STAT FAX 2600- Lavador.



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño.

⁴⁰ Ibid., p. 14.

⁴¹ Ibid., p. 14.

5. Agregar 100µl del conjugado HRP a cada pocillo, sellar la microplaca/tiras e incubar a 37c por una hora.
6. Repetir el paso 4.

Figure 16. STAT FAX 2600-Lavador.



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño.

7. Agregar 100µl de la solución de sustrato a cada pocillo e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (18-25c). Activar el cronometro una vez que haya llenado el primer pocillo.
8. Frenar la reacción agregando 50 µl de la solución frenadora en el mismo orden como con la solución substrato en el paso #7.
9. Medir la densidad óptica (DO) de las muestras y o controles a 450nm con un fotómetro para microplacas (aire como blanco). Medir la densidad óptica dentro de 15 minutos después de haber agregado la solución frenadora para así prevenir la fluctuación de los valores de OD.⁴²

⁴² Ibid., p. 14.

Figure 17. STAT FAX 3200- Lector.



Fuente: Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad de Nariño.

Nota: La cantidad de muestra necesaria para el montaje de la Prueba varía, las especificaciones propias de cada patología a evaluar están disponibles en el inserto incluido en el Kit.

i. CALCULOS

Los cálculos de los resultados se realizan en dos pasos.

1. Valores de Densidad Óptica Corregidos (DO Corr)

Los valores de densidad óptica (DO) de los pocillos recubiertos con el antígeno se corrigen restando los valores de OD de los pocillos correspondientes que contienen el antígeno control.

$$\text{OD (Antígeno)} - \text{DO (control)} = \text{OD Corr.}$$

2. Valores positivos porcentuales (PP)

Todos los valores de DO corregidos de las muestras y controles negativos (c neg.) se relacionan con el valor de DO corregido del control positivo.⁴³

$$\text{PP} = \frac{\text{DO Corr. Muestra o control neg.}}{\text{DO Corr. Control positivo.}} \times 100$$

⁴³ Ibid., p. 15.

j. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura de los resultados puede ser valorada tanto visual como colorimétricamente. A simple vista, pueden ser leídos ciertos ensayos rutinarios en los que no haga falta una cuantificación y no se presenten abundantes casos dudosos (el ojo humano no es capaz de discernir una variación de 0,1 de densidad óptica) ya que dicha lectura visual tendrá el inconveniente de la subjetividad y el de diagnosticar equivocadamente los casos límite.

Una de las grandes ventajas de la técnica ELISA es la posible automatización de la lectura y, por lo tanto, su objetividad. Dicha automatización se puede conseguir con un simple colorímetro o espectrofotómetro de cubeta o con sofisticados equipos de lectura automática de microplacas.

Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente mediante valores de absorbencia o densidad óptica que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada.

Criterios de validéz de la prueba: para confirmar la validéz, los valores duplicados de DO del control positivo no debe diferir en más de un 25 % del valor medio de los dos duplicados. Además, los valores (de suero y leche) deben encontrarse entre los siguientes límites:

DO Corr.	Control positivo	0,5
PP	Control negativo	7

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se considerará válida. Si la prueba no es válida, es probable que se deba a la técnica empleada y la prueba debe repetirse.⁴⁴

⁴⁴ Ibid., p. 16.

Tabla 5. Resultados Incubación corta (1hora) Kit SVANOVA®

Muestra	PP	Interpretación
Suero (µl)	()	Negativo
	()	Dudoso
	()	Positivo
Suero (µl)	()	Negativo
	()	Positivo
Leche	()	Negativo
	()	Positivo
Fuente: Inserto Kit de ELISA, SVANOVIR®		
Nota: Los valores mostrados de PP son propios de la patología evaluar, por lo tanto se debe remitir a los insertos propios de cada Kit y marca.		

Tabla 6. Interpretación de Resultados Incubación Larga (Durante la Noche) Kit SVANOVA®

Muestra	PP	Interpretación
Suero (µl)	()	Negativo
	()	Dudoso
	()	Positivo
Suero (µl)	()	Negativo
	()	Positivo
Leche	()	Negativo
	()	Positivo
Fuente: Inserto Kit de ELISA, SVANOVIR®		
Nota: Los valores mostrados de PP son propios de la patología evaluar, por lo tanto se debe remitir a los insertos propios de cada Kit y marca.		

Para confirmar los resultados de la prueba, los valores duplicados de PP positivos y negativos deben interpretarse por igual y por separados. En caso de discrepancia, se recomienda repetir la prueba.

En caso de duda la prueba debe repetirse. Si el resultado es todavía dudoso, se recomienda correr una segunda muestra del animal, obtenida después obtenida después de un periodo de por lo menos 3 semanas.

Interpretación de las muestras de leche en tanque

PP	Interpretación
()	Hatos negativos
()	Dudoso/ repetir la prueba
()	Hatos positivos

k. CONTROL DE CALIDAD.

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros de control patológico, sueros controles, realizar mantenimiento y calibrar equipos.

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio control de calidad y establecer correcciones en los casos de que los controles no cumplan con las tolerancias.

I. FORMULARIO DE IMPRESOS

1. Formulario de recepción de muestras.

 Universidad de Nariño	CLÍNICA VETERINARIA CARLOS MARTINEZ HOYOS CENTRO DE DIAGNOSTICO VETERINARIO SOLICITUD DE EXAMENES DE LABORATORIO	Código: CVE-PRS- FR-07
		Página: 1 de 1
		Versión: 1
		Vigente a Partir de 01/10/2008

FECHA: _____ FACTURA N° _____ DOCTOR: _____
PROPIETARIO: _____ PACIENTE: _____ ESPECIE: _____ RAZA: _____
SEXO: _____ EDAD: _____ PROCEDENCIA: _____
HACIENDA: _____
MUESTRAS RECIBIDAS: _____
EXAMEN SOLICITADO:

1.	_____
2.	_____
3.	_____
4.	_____
5.	_____
6.	_____
7.	_____

HEMOGRAMA: HTO _____ HB _____ VCM _____ CHCM _____ HCM _____ RGR _____ RGB _____ PROT _____ g/dl
NEU _____ LIN _____ EOS _____ MON _____ BAS _____ BAN _____ GRN _____
OBS: _____
ANAMNESIS: _____

Ciudad Universitaria - Torobajo - Teléfonos: 7314298 - 7311449 Ext. 214 San Juan de Pasto

2. Formulario de entrega de resultados.

 Universidad de Narino	CLINICA VETERINARIA CARLOS MARTINEZ HOYOS CENTRO DE DIAGNOSTICO VETERINARIO REPORTE DE LABORATORIO Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA	Código: Página: 1 de 1 Versión: Vigente a Partir de:
---	---	---

FECHA DE IMPRESION: FECHA DE EMISION: DEPARTAMENTO: MUNICIPIO: PROPIETARIO:	FECHA DE INGRESO: No. CASO: IDENTIFICACION: ESPECIE : SOLICITANTE:
---	--

PRUEBA:

TECNICA:

INTERPRETACION		
POSITIVO	NEGATIVO	SOSPECHOSO
% PC MAYOR AL %	% PC MENOR AL %	ENTRE: % - %.

IDENTIFICACION	% PC	RESULTADO

OBSERVACIONES: _____

Bacterióloga que realiza la prueba:	Firma:
M.V. y Director Técnico del Laboratorio Autorizado:	Firma:

NOTA: Los resultados solo son validos para la muestra procesada*Valor Referencia.

II. PAUTAS DE MANTENIMIENTO BÁSICO DE EQUIPOS.

Mantenimiento básico del analizador de ELISA (espectrofotómetro).

Frecuencia: Diaria

1. Revisar que los sensores ópticos de cada canal estén limpios. Si se detecta suciedad, limpiar con un pincel la superficie de las ventanas de los emisores de luz y de los sensores.
2. Confirmar que el sistema de iluminación esté limpio.
3. Verificar que la calibración del analizador es adecuada. Cuando se inicien las operaciones diarias, permitir que el analizador se caliente durante 30 minutos. A continuación, realizar una lectura en blanco y luego leer un módulo lleno de sustrato.

Las lecturas deben ser idénticas. Si no lo son, invertir el módulo y repetir la lectura, a fin de determinar si la desviación se origina en el módulo o en el lector.

4. Examinar el avance automático de la placa. El mismo debe ser suave y constante. Mantenimiento preventivo.

Frecuencia: Trimestral

1. Verificar la estabilidad de la lámpara. Usar el filtro de calibración, efectuando lecturas con intervalos de 30 minutos o una misma placa. Comparar las lecturas. No deben existir diferencias.
2. Limpiar los sistemas ópticos de los detectores y los sistemas de iluminación.
3. Limpiar el mecanismo de avance de la placa.
4. Verificar la alineación de cada pozo con los sistemas emisores y detectores de luz. Anexo A.

Mantenimiento básico del lavador de ELISA.

Frecuencia: Diaria

1. Verificar el volumen dispensado.
2. Comprobar la uniformidad del llenado.
3. Verificar la eficiencia del subsistema de aspiración.
4. Confirmar la limpieza de las agujas de suministro y extracción.
5. Limpiar el lavador con agua destilada después de haberlo utilizado, para remover cualquier vestigio de sal en los conductos de los subsistemas de suministro y extracción. Las agujas pueden mantenerse sumergidas en agua destilada.
6. Verificar la limpieza del cuerpo del lavador. Si es del caso, limpiar las superficies exteriores con una pieza de tela humedecida, con un detergente suave.

Frecuencia: Trimestral

1. Desensamblar y limpiar los conductos y conectores. Verificar la integridad de los mismos. Si se detectan fugas o vestigios de corrosión, ajustar y/o reemplazar.
2. Verificar la integridad de los componentes mecánicos. Lubricar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
3. Comprobar el ajuste de cada uno de los subsistemas. Calibrar de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
4. Confirmar la integridad del conector eléctrico y el cable de interconexión.
5. Verificar la integridad del fusible, y que sus puntos de contacto estén limpios. Anexo C.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Las exigencias de calidad en los laboratorios requieren una serie de consideraciones de tipo logístico, en infraestructura, personal administrativo y profesional que garanticen la implementación adecuada de los diferentes ítems de calidad establecidos nacional e internacionalmente; dentro de estas exigencias están la de homogenizar al máximo las operaciones dentro de una de la aéreas que se quieren mejorar, en estos los manuales de procedimientos juegan un papel importante.

El manual de procedimientos se desarrolló de acuerdo a las condiciones propias de Laboratorio de Diagnostico Veterinario, teniendo en cuenta el tipo de equipos empleados, su ubicación y características especiales, ya que pueden presentarse diferencias relacionadas con la técnica y los procedimientos de un laboratorio a otro.

En cuanto a la técnica utilizada en la prueba de diagnostico se concluye en su totalidad, la existencia de pasos generales y específicos durante en el procedimiento de la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA, las variaciones en el procedimiento radican; en el tipo de ELISA a desarrollar, tipo de muestra a evaluar y especificaciones propias de cada kit.

Este manual se convierte en una evidencia fiable del control de calidad de los procedimientos internos del laboratorio, además que da cumplimiento a los requerimientos legales de la Resolución 1599 de 2007, del ICA, para el registro de los mismos.

Al mismo tiempo se convierte en una herramienta académica tanto para los docentes como para estudiantes de la universidad de Nariño, dentro de las diferentes asignaturas brindadas en el programa de Medicina Veterinaria.

Este trabajo es un primer paso en la aplicación de la prueba en el laboratorio, ya que es necesario referenciar y estandarizar valores propios de nuestra región mediante la elaboración de investigaciones que permitan establecer los valores de referencia propios del laboratorio.

7.2 RECOMENDACIONES

- Realizar control de calidad diario, en el montaje de la prueba, con el uso de los sueros controles negativo y positivo propios de cada Kit.
- Calibrar preventiva y correctivamente los equipos, para evitar alteraciones en la emisión de resultados.
- Capacitación y actualización al personal de laboratorio, para prestar un mejor servicio.
- La previa estandarización de cada prueba, permite tener puntos de corte (referencias), que son elementos claves a la hora de realizar la interpretación.

BIBLIOGRAFÍA

BOURS C. EDUARDO, Guía para la elaboración de manuales de procedimientos Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/1017962/manual-de-procedimientos-de-laboratorio-clinico-veterinario-2>.

CROWTHER R. JOHN, The ELISA guidebook. 2da edición. Vienna: Austria 2009.

ELISA SVANOVIR®, Manual de Kits. BLV gp51: N° artículos 10-2351-02 y 10-2351-10. Disponible en: customer.servive@SVANOVA.com.

GOYENA. PEDRO, Indicaciones para la correcta toma y remisión de muestras leche de tanque, seriadas y en cuartos. Disponible en: <http://www.lactodiagnosticosur.com.ar/instructivos/TOMA%20Y%20REMISSION%20DE%20MUESTRAS%20con%20logo.pdf>.

ICA __ Resolución 001599. 2007. 4p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS. Normas Colombianas para la presentación de trabajos de investigación. Sexta actualización Santafé de Bogotá D. C. ICONTEC, 2008. 37p. NTC1486.

MAXINE M. BENJAMIN, outline of Veterinary Clinical Pathology, 3rd ed 1991. 7p.

RODRIGUEZ E. ALEJANDRO, Elaboración de los manuales de procedimientos hematológicos, serológicos, citológicos, parasitológicos, y Uroanálisis, como parte integral del proceso de calidad interno del Laboratorio de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño, 2009.

TORTORA J. Gerard, FUNKE R. Bredell, CASE I. Christine. Introducción a la microbiología, ed. Panamericana, 2007. p. 543.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio, Washington D.C., 2005.

Disponible en: http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab_manual-mantenimiento.pdf

PALMA. JOSE, Manual de procedimientos. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos13/mapro/mapro.shtml>.

X FUENTES ARDERIU, Bioquímica Clínica y patológica molecular. Vol. 1, editorial Reverte, 1998. P.352.

ZAPATA, Wildeman y FAJARDO, Holtman, Manual de química Sanguínea veterinaria Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/51164083/Manual-de-quimica-sangunea-vete>.

ANEXO C

REGISTRO DE MANTENIMIENTO STAT FAX 2200 - INCUBADOR/SHAKER

MES: _____

MANTENIMIENTO DIARIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1- Limpiar el equipo.*																															
2- Encender el equipo.																															
3- Seleccionar la temperatura de trabajo.																															

* El equipo solo requiere que se limpie con un paño seco. En caso de estar presentes sales acumuladas, retirarlas con un paño húmedo y después secar. Si lo desea puede utilizar alcohol isopropílico al 70% para la limpieza del equipo. NOTA: No utilizar soluciones abrasivas.

MANTENIMIENTO SEMESTRAL
 Mantenimiento preventivo externo e interno por personal calificado.

ANEXO D

REGISTRO DE MANTENIMIENTO STAT FAX 2600 - LAVADOR

MES: _____

MANTENIMIENTO DIARIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1- Limpiar el equipo. 2- Empezar el ciclo de lavado. 3- Al finalizar el equipo realizar 1 Rinse y luego 1 Prime. 4- Al finalizar el ciclo realizar 2 Rinse (dejar las mangueas con agua).																															

* El equipo solo requiere que se limpie con un paño seco. En caso de estar presentes sales acumuladas, retirarlas con un paño húmedo y después secar.
Si lo desea puede utilizar alcohol isopropilico al 70% para la limpieza del equipo. **NOTA:** No utilizar soluciones abrasivas.

MANTENIMIENTO SEMANAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1- Todo el mantenimiento diario. 2- Realizar alineación de la aguja de lavado																															

ALINEACION DE LA AGUJA DE LAVADO
1- Coloque una placa con pozos desocupados en el porta plato.
2- Seleccione la función ALIGN tecla 4, el equipo automáticamente hace la alineación

MANTENIMIENTO MENSUAL
Lavado del sistema hidráulico:
1- Agregar hipoclorito puro en las botellas de Rinse y Wash.
2- Hacer el lavado de una placa completa 2 veces y luego realizar Rinse 5 veces.
3- Cambiar el hipoclorito de las botellas Rinse y Wash por agua destilada.
4- Hacer 3 o más lavados de una placa completa hasta purgar el sistema.
5- Realizar Rinse 5 veces.

MANTENIMIENTO SEMESTRAL
Mantenimiento preventivo externo e interno por personal calificado.

ANEXO E

Recommendation!
Strips with broken seal can be stored at +2 to +8°C for up to 4 weeks.

This manual covers the following Neospora-Ab ELISA kits: Article number 10-2950-02.

References

Björkman, C., Uggla, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1497-1507.

Björkman, C., Hoshidani, O.J.M., Uggla, A., 1997. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68, 251-26.

Dobay, J.P., 1979. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1160-1163.

Dobay, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Tepper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fetal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269-1285.

Frenning, J., Lindberg, A., Björkman, C., 2006. Evaluation of an in-house ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev. Vet. Med.* In press.

Jenkins, M., Basile, T., Björkman, C., Schares, G., Williams, D., 2002. Diagnosis and sero-epidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32, 631-636.

McAllister, M.M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881-87.

Nicolas, A., Capelli, G., Raku, A., Ladu, M., Scala, A., Björkman, C., 2005. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) assessed by in-house ELISA on tank bulk milk. *Parasitol. Res.* DOI: 10.1007/s00436-005-0644-4

Woods, W., Mason, A.R., Schukken, Y.H., 1998. Abortion risk in pregnancy of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311-1316.

Manufacturer
Svanova Biotech AB
Uppsala Science Park
SE-751 83 Uppsala, Sweden
Phone +46 18 65 49 00 Fax +46 18 65 49 99
info@svanova.com www.svanova.com

Customer Service
Phone +46 18 65 49 15 Fax +46 18 65 49 99
customer.service@svanova.com

Neospora caninum iscom ELISA
(Neospora-Ab)
SVANOVIR®

ELISA test for the detection of *Neospora caninum* antibodies in serum and milk, individual and bulk tank milk samples

General information

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan parasite, which was first described in dogs with neurological disease. *N. caninum* infection is now recognized to be a major cause of bovine abortion and stillbirth worldwide. The parasite is efficiently transmitted transplacentally from an infected cow to her foetus during pregnancy. This results in abortion, birth of a weak calf, or birth of a clinically healthy but persistently infected calf. The mechanism by which the parasite is transmitted from dam to foetus is unknown, as are the factors, which determine the outcome of infection. Transplacental transmission can occur during consecutive pregnancies and congenitally-infected heifers can later transmit the parasite to their own offspring, thus the parasite can persist for a long time in an infected herd without involvement of a definitive host. Cattle can also be infected through ingestion of oocysts shed in the faeces of acutely infected dogs, a definitive host of *N. caninum*.

N. caninum induced abortion can occur throughout pregnancy and may include stillbirth at full term but abortions at 5-7 months of gestation is the most common. Bovine abortions caused by *N. caninum* may show epidemic as well as endemic patterns. Epidemiological data indicate that external or point source infections are the most likely cause of abortion outbreaks, whereas a high level or an increase in the annual abortion rate may be a consequence of predominantly transplacental transmission.

A diagnosis of *N. caninum* infection can be confirmed by histological investigation of tissue collected at autopsy, combined with demonstration of the parasite by specific immunohistological staining, by PCR or by isolation of the parasite in cell culture. In the live animal, presence of IgG antibodies directed to *N. caninum* in serum and milk indicate that an individual is or has been infected by the parasite. Antibody assays can also be applied on foetal fluid.

Principle

The *N. caninum* iscom ELISA Kit is designed to detect bovine *Neospora*-specific antibodies in serum. The kit procedure is based on a solid-phase indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In this procedure, serum samples are exposed to noninfectious *Neospora* antigen incorporated into iscom coated onto wells of microtiter strips. *Neospora* antibodies (if present in the serum sample) bind parasite antigen in the wells. The HRP conjugate added subsequently forms a complex with these *Neospora* antibodies. Unbound material is removed by rinsing before the addition of substrate solution. Subsequently a blue colour develops which is due to the conversion of the substrate by the conjugate. A positive result is indicated by development of a blue colour. The reaction of abortion outbreaks, whereas a high level or an increase in the annual abortion rate may be a consequence of predominantly transplacental transmission.

The kit procedure is based on a solid-phase indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In this procedure, serum samples are exposed to noninfectious *Neospora* antigen incorporated into iscom coated onto wells of microtiter strips. *Neospora* antibodies (if present in the serum sample) bind parasite antigen in the wells. The HRP conjugate added subsequently forms a complex with these *Neospora* antibodies. Unbound material is removed by rinsing before the addition of substrate solution. Subsequently a blue colour develops which is due to the conversion of the substrate by the conjugate. A positive result is indicated by development of a blue colour. The reaction is stopped by addition of the stop solution; the colour changes to yellow. The result can be read

visually or by a microplate photometer, where the optical density (OD) is measured at 450 nm.

Contents

- Neospora antigen coated microtiter strips (sealed and stored dry)
- Lyophilized HRP Conjugate (horsesradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG monoclonal antibodies)
- PBS-Tween Solution 20x concentrate
- Substrate Solution - (tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H₂O₂) - STOP IN THE DARK
- Stop Solution - contains sulphuric acid - COERCIVE®
- A. Positive Control Serum - 0.05% Merhiolase
- B. Negative Control Serum - 0.05% Merhiolase

Material needed but not provided

1. Precision pipettes (range from 5 to 2000 µl)
2. Disposable pipette tips
3. Distilled water
4. Wash bottle
5. 1 Container, 1 to 2 litres for PBS-Tween
6. Microplate photometer, 450 nm filter

Specimen information

Serum: 5 µl of serum or plasma is needed for each sample well. Fresh, refrigerated, or previously frozen serum or plasma may be tested.

Milk: 50 µl of skim milk is required for each sample well. Milk samples must be centrifuged for 15 minutes at 2000 x g to remove the lipid layer, or leave the milk samples until the fat layer is formed on top of the sample. Pipette under the fat layer.

Preparation of reagents

PBS-Tween Buffer: Dilute the PBS-Tween Solution 20x concentrate 1/20 in distilled water. Prepare 500 ml per plate by adding 25 ml PBST solution to 475 ml distilled water and mix thoroughly.

N.B. Please check that there is no crystal precipitation in the bottle. If crystals are seen, please warm and shake well.

Pre-dilution of controls and samples: For testing, the serum control and serum sample should be pre-diluted 1/100 in PBS-Tween Buffer (for example 5 µl sample into 495 µl of PBS-Tween buffer).

HRP Conjugate: Reconstitute the lyophilized HRP Conjugate with 11.5 ml PBS-Tween Buffer. Add the buffer carefully to the bottle. Leave the solution one minute and mix thoroughly on a shaker. Prepare immediately before use. The remaining reconstituted conjugate can be stored at -20°C and thawed and refrozen up to 3 times.

Precautions

1. Carefully read and follow all instructions.
2. Store the kit and all reagents at +2 to +8°C (35 to 45°F).
3. All reagents should equilibrate to room temperature 18 to 25°C (64 to 77°F) before use.
4. Handle all materials according to the Good Laboratory Practice.
5. Do not mix components of instruction booklets from different test kits.
6. Care should be taken to prevent contamination of kit components.
7. Do not use test kit beyond date of expiry.
8. Do not eat, drink, or smoke where specimens or kit reagents are handled.
9. Use a separate pipette tip for each sample.
10. Do not pipette by mouth.
11. Include positive and negative serum controls on each plate or test strip series.
12. Use only distilled water for preparation of reagents.
13. The Stop Solution contains sulphuric acid, which is corrosive.
14. All unused biological materials should be disposed according to the local, regional and national regulations.

Procedure

1. All reagents should equilibrate to room temperature 18 to 25°C (64 to 77°F) before use.
2. In duplicates, add 100 µl of pre-diluted Positive Control Serum (Reagent A) and Negative Control Serum (Reagent B) respectively, into selected wells.
3. Serum samples. Add 100 µl of pre-diluted sample to selected well(s). The samples can be tested individually or in duplicates. However for confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.
4. Milk samples. Add 50 µl of PBS-Tween to all selected wells followed by 50 µl of skimmed milk. The samples can be tested individually or in duplicates. However for confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.
5. Seal the plate/strip and shake thoroughly. Incubate for 1 hour at 37°C (98.6°F).
6. Rinse the plate/strip 3 times with PBS-Tween Buffer: at each rinse cycle fill up the wells, empty the plate and tap hard to remove all remains of fluid.
7. Add 100 µl HRP Conjugate to each well. Seal the plate/strip and incubate for 1 hour at 37°C (98.6°F).
8. Repeat step #6.
9. Add 100 µl Substrate Solution to each well. Incubate for 10 minutes at room temperature (18 to 25°C). Begin timing when the first well is filled.
10. Stop the reaction by adding 50 µl of Stop Solution to each well and mix thoroughly. Add the Stop Solution in the same order as the Substrate Solution in step #9.
11. Measure the optical density (OD) of the controls and samples at 450 nm in a microplate photometer (use air on blank). Measure the OD within 15 minutes after the addition of Stop Solution to prevent fluctuation in OD values.

Calculations

Calculation of Percent Positivity Values (PP)

All OD Values for the test samples as well as the Negative Control (Reagent B) are related to the OD value of the positive control as follows:

$$PP = \frac{\text{Mean OD value (Sample or Neg Control)}}{\text{Mean OD value Positive control}} \times 100$$

It is recommended to retest all samples with a positive reaction.

Interpretation of the results

Criteria for test validity

To ensure validity, the duplicate of the OD values should not differ more than 25% from each other. Additionally, the control values should fall within the following limits

OD positive control > 0.8
OD Negative control < 0.15

For invalid tests, technique may be suspect and the assay should be repeated.

Interpretation of serum and milk samples

PP	Interpretation
< 20	Negative
≥ 20	Positive