

**Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen
Test Kit/Serum Plus**

**Kit de détection antigénique du Virus de la
Diarrhée Virale Bovine (BVDV)/Sérum Plus**

**Kit para Detecção de Antígeno do Vírus da
Diarreia Viral Bovina (BVDV)/Soro Plus**

**Kit para la detección de Antígeno del virus de la
Diarrea Vírica Bovina (BVDV)/Suero Plus**

**Testkit zum Nachweis von Antigen des Bovinen
Virus Diarrhoe Virus (BVDV)/Serum Plus**

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.

**Test per la ricerca dell'antigene del virus della
diarreia virale bovina (BVDV)/Siero Plus**

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus

06-43860-13

Test With Confidence™

IDEXX

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus

For veterinary use only.

Name and Intended Use

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection of BVDV antigens in bovine serum, plasma, whole blood and ear notch tissue samples.

General Information

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Border Disease Virus (BDV) and Hog Cholera Virus (Classical Swine Fever Virus, CSFV) are the three member viruses of the genus Pestivirus within the family Flaviviridae. BVDV is one of the most important pathogenic viruses in cattle, causing considerable losses in the dairy and beef industries worldwide. The typical symptoms of the BVDV infection are diarrhoea, fever, followed by reduction in the milk production. The immune suppressive effect of BVDV may potentiate infection by other microorganisms. The virus crosses the placenta in infected, pregnant cows causing reproductive losses due to abortions, stillborn calves or calves that die early in life. Some calves that survive are immunotolerant to the virus and these animals excrete large amounts of infectious virus for their entire lives. It is important to identify these persistently infected animals to break the cycle of infections in herds. The persistently infected animals often die of "mucosal disease" in the first two years of life. As a consequence of the in-utero infection, BVDV is a frequent contaminant of biological products, such as vaccines and pharmaceuticals. BDV causes similar disease syndromes in sheep, while CSFV cause serious losses in the pig industry since it is highly pathogenic and can cause widespread deaths.

Descriptions and Principles

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus is an enzyme immunoassay designed to detect BVDV antigens (Ag) in serum, plasma, whole blood and ear notch tissue in cattle. A microtitration format has been configured by immobilizing specific monoclonal antibodies for BVDV (E^{rns}) on the plates. BVDV Ag of the sample is captured on the plates. After incubation of the test sample in the well, captured BVDV Ag is detected by specific antibodies and a horseradish-peroxidase conjugate. Next, unbound conjugate is washed away and a substrate/chromogen solution is added. In the presence of enzyme, substrate is converted into a product which reacts with the chromogen to generate a blue color. Upon addition of the stop solution, a yellow color is generated. The absorbance is measured using a spectrophotometer. The corrected OD value of the samples is calculated by using the absorbance obtained with the test sample and corrected for the absorbance of the negative control.

| Reagents | | Volume | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|
| 1 | Anti-ERns mAb Coated Plate | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Positive Control | 1 x 1.6 mL | 1 x 2.0 mL | 1 x 6.5 mL |
| 3 | Negative Control | 1 x 1.6 mL | 1 x 2.0 mL | 1 x 6.5 mL |
| 4 | Conjugate | 1 x 25 mL | 1 x 60 mL | 1 x 350 mL |
| 5 | Ear Notch Tissue Soaking Buffer | 1 x 80 mL | 2 x 80 mL | 2 x 480 mL |
| A | TMB Substrate N.12 | 1 x 20 mL | 1 x 60 mL | 1 x 400 mL |
| B | Stop Solution N.3 | 1 x 20 mL | 1 x 60 mL | 1 x 400 mL |
| C | Wash Concentrate (10X) | 1 x 125 mL | 1 x 480 mL | 3 x 480 mL |
| D | Detection solution | 1 x 15 mL | 1 x 30 mL | 1 x 180 mL |
| Other Components: Zip lock bag | | 1 | 1 | — |

Note: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels of this kit.

Storage

Store the reagents at 2–8°C. Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

Materials Required but Not Provided

- Precision micropipettes or multi-dispensing micropipettes
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well microplate reader (equipped with single 450 nm filter or dual filters at 450 nm and 650 nm)
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- Centrifuge (capacity 2000 x g)
- Vortex or equivalent
- Microplate shaker
- Humid Chamber/Incubator capable of maintaining a temperature of +37°C (±3°C)
- Tubes for soaking of ear notch tissue samples

Precautions and Warnings

- Handle all biological material as potentially infectious.
- Wear protective gloves/protective clothing/eye or face protection when handling samples and reagents.
- Refer to the product Material Safety Data Sheet for additional information.
- See the end of this insert for reagent hazard and precaution warnings.

Laboratory Practices

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing, and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Use a separate pipette tip for each sample and control.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components. Do not pour unused reagents back into containers.
- Do not use kit past expiration date.

Preparation of Reagents

Wash Solution

The Wash Concentrate (10X) should be brought to 18–26°C and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. The Wash Concentrate (10X) must be diluted 1 to 10 with distilled/deionized water before use (e.g., 30 mL of Wash Concentrate (10X) plus 270 mL of water per plate to be assayed). When prepared under sterile conditions, the Wash Solution can be stored for one week at 2–8°C.

Preparation of Samples

Fresh or frozen serum, plasma, whole blood or ear notch tissue samples can be tested.

Ear Notch Tissue Samples

- Use ear notch tissue plugs (samples) of 2–3 mm diameter in size (e.g., sampled by applying ear tags with attached ear notch tissue sampling device).
- If applicable, ear notch samples can remain in the sampling device for incubation.
Note: Fresh, humid, desiccated or frozen ear notch tissue samples can be tested.
- Add 150–250 μ L of IDEXX Ear Notch Soaking Buffer to the ear notch tissue. Make sure the tissue sample is completely covered with the solution (gently tap or mix).
- Allow the samples to soak in soaking buffer between 12 and 24 hours at 18–26°C or over weekend up to 72 hours at 18–26°C (or at 2–8°C). In order to avoid evaporation, it is recommended to incubate tubes sealed or in a humid chamber.
- Aspirate 50 μ L of the soaking buffer for testing. **Note:** Remaining soaking buffer can be separated from the ear notch tissue sample and stored frozen (–20°C) for later testing or for retesting.

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use. Reagents should be mixed by gentle inverting or swirling.

- 1 Obtain coated plates and record the sample position. If using partial plates, remove only those wells sufficient for samples to be tested. Place the remaining wells, along with the desiccant, in the extra zip lock bag provided and return to 2–8°C.

- 2 Dispense 50 μ L of the Detection antibodies to each well.

- 3 Dispense 50 μ L Negative Control (NC) into the appropriate wells.

- 4 Dispense 50 μ L Positive Control (PC) into the appropriate wells.

- 5 Dispense 50 μ L samples into the remaining wells.

- 6 Mix the content of the microwells by gently tapping the plate or use a microplate shaker.

- 7 Incubate for 2 hours (\pm 5 min.) at 37°C (\pm 3°C) or overnight (12–18 hours) at 2–8°C. With either option, the plates should be tightly sealed or incubated in a humid chamber using plate covers to avoid any evaporation.

- 8 Remove the solution and wash each well with approximately 300 μ L of Wash Solution 5 times. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of the next reagent. Tap each plate onto absorbent material after the final wash to remove any residual wash fluid. **Important!** Control carefully that no traces of blood are left on the walls or edges of the wells. Additional 2–3 washes can be necessary to remove the blood before proceeding to the next step.

- 9 Dispense 100 μ L of Conjugate into each well.

- 10 Incubate for 30 minutes (\pm 2 min.) at 18–26°C.

- 11 Repeat step 8.

- 12 Dispense 100 μ L of TMB Substrate N.12 solution into each well.

- 13 Incubate for 10 minutes (\pm 1 min.) at 18–26°C.

- 14 Dispense 100 μ L of Stop Solution N.3 into each well.

- 15 Measure and record the absorbance of the samples and controls at 450 nm or using a dual wavelength of 450 nm and 650 nm.

16 Calculation:

Controls

$$NC\bar{x} = \frac{NC1 A(450) + NC2 A(450)}{2}$$

$$PC\bar{x} = \frac{PC1 A(450) + PC2 A(450)}{2}$$

Validity criteria

$$NC\bar{x} \leq 0.250$$

$$PC\bar{x} - NC\bar{x} \geq 0.150$$

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert. **Note:** IDEXX has instrument and software systems available that calculate means and S-N and provide data summaries.

Samples

$$S - N = \text{Sample A}(450) - NC\bar{x}$$

The presence or absence of BVDV antigen in the sample is determined by the corrected OD value (S-N) for each sample.

17 Interpretation:

Serum, Plasma and Whole Blood Samples

| Negative | Positive |
|--------------------|-----------------|
| $S - N \leq 0.300$ | $S - N > 0.300$ |

Positive results from this assay are valid for calves of any age. Circulating high titers of maternal BVDV antibodies might interfere with the detection of BVDV antigen in serum, plasma and whole blood. Detection of BVDV antigen in serum, plasma and whole blood samples can be less sensitive after antibody intake via colostrum. "False-negative" results can occur after colostrum intake ("diagnostic gap"). In order to exclude influence of colostrum antibodies, it is recommended to test calves before colostrum intake. Negative results of calves after colostrum intake should be confirmed by re-testing at age of more than 30 days. Refer to regulation in your country if different from this description.

Ear Notch Tissue Samples

| Negative | Suspect | Positive |
|--------------------|----------------------------|-----------------|
| $S - N \leq 0.200$ | $0.200 < S - N \leq 0.300$ | $S - N > 0.300$ |

Suspect samples should be retested by using another 50 µL of the same soaking buffer. If there is less than 50 µL remaining, retesting can be done by soaking the ear notch tissue sample again (see Preparation of Samples). If the sample tests as suspect again, a blood sample should be taken and tested by ELISA with the IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, virus isolation or PCR for BVDV. If there is any doubt about the status of available, positive live animal, retest another sample collected 7 to 14 days after the initial sample was collected to confirm persistent infection. We recommend that positive results obtained with whole blood should be confirmed using serum or plasma from the same animal. When testing ear notch samples, there is no diagnostic gap.

For technical assistance:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: idexx.com/contactlpd

IDEXX and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit de détection des antigènes du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)/Sérum Plus

Réservé à l'usage vétérinaire

Définition et application

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus est un kit IDEXX de détection immunoenzymatique de l'antigène du virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) à partir du sérum, du plasma, du sang total et biopsie d'oreille chez les bovins.

Informations Générales

Le virus de la Diarrhée Virale Bovine/ Maladie des Muqueuses (BVDV/MD), le virus de la Pestivirus (BDV) et le virus de la Peste Porcine Classique (CSFV) appartiennent au genre pestivirus, famille des flaviviridae. Le BVDV est un des virus les plus pathogènes de l'espèce bovine et entraîne des pertes considérables pour les élevages de bovins laitiers et allaitants à travers le monde. Les signes cliniques associés à l'infection BVDV sont la diarrhée, la fièvre accompagnée d'une diminution de la production laitière et d'une immunosuppression. Le virus peut traverser la barrière placentaire chez les vaches portantes infectées et entraîner une baisse des performances de reproduction qui se traduit par des avortements, des veaux mort-nés ou des veaux qui meurent précocement. Parmi les veaux qui survivent, certains sont immunotolérants et excrètent alors de grandes quantités de virus infectieux durant le restant de leur vie. Il est important d'identifier ces animaux «porteurs» pour rompre le cycle infectieux au sein des troupeaux. Ces animaux porteurs succombent souvent de la "Maladie des Muqueuses" au cours des deux premières années de leur vie. En raison de l'infection in utero, le virus BVDV est un contaminant fréquent des produits biologiques, comme les vaccins et les médicaments. Le virus de la Border Disease (BDV) est responsable d'une maladie similaire dans l'espèce ovine, tandis que le virus de la Peste Porcine Classique (CSFV) engendre des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine avec un taux de mortalité élevé.

Description et principe

IDEXX BVDV/Ag Serum Plus permet la détection des antigènes du BVDV à partir du sérum, du plasma, du sang total et de biopsie d'oreille chez les bovins. Les microplaques sont sensibilisées avec des anticorps monoclonaux spécifiques de la glycoprotéine structurale (E^{ns}) du virus BVDV. L'antigène BVDV est capturé sur la plaque. Après incubation de l'échantillon à tester dans la plaque sensibilisée, les antigènes BVDV, s'ils sont présents, sont mis en évidence à l'aide d'un conjugué anticorps spécifiques couplé à la Peroxydase (HRPO). Après élimination du conjugué non-lié et lavage, on ajoute la solution de substrat/chromogène. En présence d'enzyme, la solution de substrat/chromogène est oxydée et développe une coloration bleue. L'adjonction de la solution d'arrêt entraîne un virage au jaune de la coloration. Les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre. La valeur de densité optique corrigée de chaque échantillon est calculée à partir des valeurs respectives de densité optique (DO) de l'échantillon et du Contrôle négatif.

| Réactifs | | Quantités | | |
|--|---|------------|------------|------------|
| 1 | Plaque sensibilisée avec des Ac monoclon. anti-ERns | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Contrôle positif | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Contrôle négatif | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Conjugué | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Tampon d'éluion pour biopsies d'oreille | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | Substrat TMB N°12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Solution d'arrêt N°3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Solution de lavage concentrée (10X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Solution de détection | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Autres composants: sachet plastique hermétique réutilisable | | 1 | 1 | — |

Remarque: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes de la trousse.

Conservation

Conserver les réactifs à 2–8°C. Les réactifs sont stables jusqu'à leur date de péremption à condition d'être conservés correctement.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de précision ou pipettes multicanaux
- Embouts de pipette à usage unique
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé d'un filtre à 450 ou 450/650 nm)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs
- Couvercles pour microplaques, aluminium ou adhésifs
- Centrifugeuse (capacité 2000 x g)
- Vortex ou équivalent
- Agitateur de microplaques
- Chambre humide / Incubateur de plaques capable de maintenir une température de +37°C (±3°C)
- Tubes pour éluion des prélèvements de biopsie d'oreille

Précautions d'emploi et mises en garde

- Manipuler tous les réactifs et les échantillons comme une source potentielle de contamination.
- Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux ou du visage lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
- Se reporter à la fiche de sécurité du produit pour plus d'informations.
- Voir à la fin du mode d'emploi pour les risques et mesures de prévention liés aux réactifs.

Pratiques de laboratoire

- Des résultats optimaux seront obtenus en se conformant de manière stricte au protocole fourni.
La précision du test dépend des éléments suivants: pipetage, minutage et lavage minutieux au cours de cette procédure. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon et chaque contrôle.
- Ne pas exposer la solution de substrat TMB à la lumière directe du soleil ou à des agents oxydants.
Veiller à la propreté de la verrerie et/ou du matériel de laboratoire en matière plastique utilisés lors de sa manipulation.
- Tous les déchets doivent être correctement décontaminés avant leur élimination. Éliminer les contenus selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Éviter la contamination des composants du kit. Ne pas verser les réactifs non utilisés de nouveau dans les conteneurs.
- Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption.

Préparation des réactifs

Solution de lavage

Porter la Solution de lavage concentrée (10X) à 18–26°C et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La Solution de lavage concentrée (10X) est à diluer au 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée (exemple: 30 ml de Solution de lavage concentrée (10X) + 270 ml d'eau par microplaque). La Solution de lavage reconstituée, lorsqu'elle est préparée de façon stérile, peut être conservée pendant une semaine à 2–8°C.

Préparation des échantillons

Les échantillons de sérum, de plasma, de sang total ou de biopsie d'oreille, frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

Biopsie d'oreille

- Le prélèvement est effectué à l'aide d'un emporte-pièce de 2–3 mm de diamètre (prélèvement de l'échantillon lors de l'insertion de la plaque d'oreille).
- Il est possible de laisser les biopsies d'oreilles dans le tube de prélèvement pour l'éluat.
Remarque: les biopsies d'oreille fraîches, humides, sèches ou congelées peuvent être utilisées.
- Distribuer respectivement dans chaque tube contenant un prélèvement de biopsie d'oreille 150–250 μ l de tampon d'éluat. S'assurer que le prélèvement soit bien immergé (agiter ou vortexer au besoin).
- Eluer entre 12 et 24 heures à 18–26°C ou pendant le weekend jusqu'à 72 heures à 18–26°C (ou à 2–8°C). Pour éviter toute évaporation, il est recommandé d'incuber les échantillons dans des tubes scellés ou en chambre humide.

- Transférer l'éluat dans la plaque sensibilisée à raison de 50 μ l par puits.

Remarque: La quantité d'éluat restante peut être aliquotée après extraction du prélèvement de tissu, conservée au congélateur à –20°C et faire l'objet d'un test à une date ultérieure.

Remarque: Dans le cadre du programme français ACERSA de certification "Bovin non IPI" sur matrice de biopsies d'oreille, utiliser uniquement les paramètres suivants:

- Préparation des échantillons:
 - Distribuer 250 μ l de Tampon d'éluat dans chaque tube contenant un prélèvement de biopsie d'oreille.
 - Eluer entre 18 et 24 heures à 18–26°C.
- Mode opératoire:
 - incuber les échantillons 2 heures (\pm 5 min.) à 37°C (\pm 3°C).

Mode opératoire

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien homogénéiser par agitation douce ou inversion.

- 1 Réserver le nombre de plaque(s) sensibilisée(s) nécessaire(s) à la manipulation et établir le plan de distribution d'échantillons sur la microplaque. En cas d'utilisation d'une portion de plaque seulement, retirer le nombre de barrettes requises pour les échantillons à tester et replacer le reste de la plaque dans le sachet plastique fournis avec le dessiccant à 2–8°C.

- 2 Distribuer dans chaque puits de la microplaque sensibilisée 50 µl de Solution de détection.

- 3 Distribuer dans les puits appropriés 50 µl de Contrôle négatif (CN).

- 4 Distribuer dans les puits appropriés 50 µl de Contrôle positif (CP).

- 5 Distribuer 50 µl d'échantillon dans les puits disponibles adjacents.

- 6 Bien homogénéiser le contenu de la plaque en tappant doucement le côté de la plaque ou en utilisant un agitateur de plaque.

- 7 Incuber 2 heures (±5 min.) à 37°C (±3°C) ou une nuit (12 à 18h) à 2–8°C. Quelle que soit l'option choisie, recouvrir les plaques d'un film adhésif afin de garantir toute évaporation ou incuber avec couvre-plaques en chambre humide.

- 8 Eliminer le liquide contenu dans les puits de la microplaque et laver 5 fois chaque puits avec environ 300 µl de Solution de lavage. Eviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du prochain réactif. Après le dernier lavage, vider le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la plaque sur du papier absorbant.
Important! Bien s'assurer qu'aucune trace de sang résiduel ne subsiste sur les parois ou les bords des puits de la plaque. Si tel était le cas, exécuter 2 ou 3 cycles de lavage supplémentaires avant de passer à l'étape suivante.

- 9 Distribuer 100 µl de Conjugué dans chaque puits.

- 10 Incuber 30 minutes (±2 min.) à 18–26°C.

- 11 Répéter l'étape 8.

- 12 Distribuer 100 µl de Substrat TMB N°12 dans chaque puits.

- 13 Incuber 10 minutes (±1 min.) à 18–26°C.

- 14 Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt N°3 dans chaque puits.

- 15 Lire la densité optique respective des échantillons et des contrôles à l'aide d'un lecteur de microplaques en monochromatisme à 450 nm, ou en bichromatisme à 450 / 650 nm.

16 Calculs:

Contrôles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Critères de validité

$$CN\bar{x} \leq 0,250$$

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq 0,150$$

Si le test est invalide, la technique doit être suspectée et le test répété en suivant scrupuleusement le mode opératoire. **Note:** IDEXX est en mesure de vous fournir matériel et logiciel informatique pour le calcul des résultats et l'enregistrement des données.

Echantillons

$$E - N = \text{Echantillon A(450)} - CN\bar{x}$$

Répéter le test en cas de non-validation en respectant attentivement le protocole opératoire. La présence ou l'absence d'antigène BVDV est déterminée par le calcul de la valeur de densité optique corrigée de chaque échantillon.

17 Interprétation:

Sérum, Plasma et Sang Total

Négatifs

Positifs

$$E - N \leq 0,300$$

$$E - N > 0,300$$

Tout résultat **positif** obtenu est valable chez le veau à tout âge. Des titres élevés d'anticorps circulants d'origine maternelle peuvent interférer avec la détection d'antigène BVDV chez le veau. La détection des antigènes BVDV à partir du sérum, du plasma ou du sang total peut être moins sensible après ingestion du colostrum à cause des anticorps maternels qui y sont présents. Des résultats « faux négatifs » peuvent dès lors apparaître après ingestion de colostrum (« écart de diagnostic »).

Afin d'écarter l'influence de ces anticorps maternels colostraux, il est recommandé de tester les veaux avant ingestion de colostrum. Les résultats négatifs observés chez des veaux testés après prise de colostrum doivent être recontrôlés à l'âge de 30 jours ou plus. Veuillez-vous référer à la réglementation en vigueur dans votre pays si elle diffère des instructions ci-dessus.

Biopsie d'oreille

Négatifs

Douteux

Positifs

$$E - N \leq 0,200$$

$$0,200 < E - N \leq 0,300$$

$$E - N > 0,300$$

Les échantillons qualifiés de **douteux** sont retestés à partir du reliquat des éluats correspondants. Si la quantité d'éluat résiduelle est insuffisante, procéder à une seconde élution (voir Préparation des échantillons). Si le résultat douteux est confirmé, un prélèvement sanguin sera initié et testé en ELISA IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, en Culture Cellulaire ou en PCR. En cas de doute quant au statut positif d'un animal à haute valeur ajoutée, tester un nouvel échantillon prélevé 7 à 14 jours après le prélèvement initial pour confirmer la persistance de l'infection. Il est fortement recommandé de confirmer tout résultat positif sur échantillon de sang total à partir du sérum ou du plasma du même animal. La détection sur biopsies d'oreilles évite les écarts de diagnostic.

Pour l'assistance technique:

IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

Contactez votre responsable de secteur IDEXX ou votre distributeur ou visitez notre site web:
idexx.com/contactpd

IDEXX et Test With Confidence sont des marques de commerce ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories, Inc. ou ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para Detecção de Antígeno do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)/Soro Plus

Para uso exclusivamente veterinário

Nome e Indicações

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de antígenos de BVDV em amostras de soro, plasma, sangue total e fragmento de orelha em bovinos.

Informações gerais

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), o Vírus da Doença da Fronteira (BDV) e o Vírus da Cólera Suína (Vírus da Peste Suína Clássica, CSFV) são os três membros do gênero Pestivirus dentro da família Flaviviridae. O BVDV é um dos vírus patogênicos mais importantes para os bovinos, causando perdas consideráveis para as indústrias leiteiras e de carne em todo o mundo. Os sintomas típicos da infecção por BVDV são diarreia e febre seguidas por redução da produção de leite. O efeito imunossupressivo do BVDV pode potencializar a infecção por outros microorganismos. O vírus atravessa a placenta de vacas prenhes infectadas causando perdas reprodutivas devido a abortos, bezerros natimortos ou bezerros com mortalidade precoce. Alguns bezerros que sobrevivem são imunotolerantes e excretam grandes quantidades de vírus durante toda a sua vida. É importante identificar estes animais portadores para quebrar o ciclo da infecção nos rebanhos. Os animais portadores freqüentemente morrem de "doença das mucosas" nos primeiros dois anos de vida. Como consequência da infecção intra-uterina, o BVD é um contaminante freqüente de produtos biológicos, como vacinas e medicamentos. O BVD causa doenças similares em ovelhas, enquanto o CSFV causa sérias perdas na indústria suína já que ele é altamente patogênico e pode causar mortes disseminadas.

Description et principe

IDEXX BVDV Ag/soro Plus é um ensaio imunoenzimático desenvolvido para detecção de antígenos (Ag) de BVDV em soro, plasma, sangue total e fragmento de orelha em bovinos. Um formato de microtitulação foi configurado através da impregnação de anticorpos monoclonais específicos para BVDV (E^{ms}) nas placas. O antígeno de BVDV da amostra é capturado nas placas. Após a incubação das amostras de teste nas cavidades, antígenos capturados de BVDV são detectados pelos anticorpos específicos e por um conjugado de peroxidase de raiz forte anti-bovino. Depois o conjugado não aderido é lavado e uma solução de substrato/cromógeno é adicionada. Na presença da enzima, o substrato é convertido em um produto que reage com o cromógeno para gerar uma coloração azul. Após a adição da solução de Interrupção, uma coloração amarela é formada. A absorbância é medida usando-se um espectrofotômetro. O valor de DO corrigido das amostras é calculado usando-se a absorbância obtida com a amostra de teste corrigida para a absorbância do controle negativo.

| Reagentes | | Volume | | |
|--|--|------------|------------|------------|
| 1 | Placa Impregnada com Ac nonocl.anti-ERns | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Controle Positivo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Controle Negativo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Conjugado | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Tampão para o fragmento da orelha | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | Substrato TMB No.12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Solução de Interrupção No.3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Concentrado de Lavagem (10X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Solução Detectora | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Outros componente: embalagem tipo ziplock | | 1 | 1 | – |

Nota: Ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados na inserte e nos rótulos deste kit.

Armazenagem

Conservar os reagentes a 2–8°C. Os reagentes são estáveis até a data de validade, desde que sejam devidamente conservados.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Micropipetas de precisão monocanal e multicanal
- Ponteiras descartáveis
- Proveta graduada para a solução de lavagem
- Leitor de placas para 96 cavidades (equipado com filtro de 450 nm ou em duplo filtro de 450 nm e 650 nm)
- Lavador de microplaca (sistema manual, semi-automático ou automático)
- Use somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste
- Tampa para placas (tampa plástica, papel alumínio ou adesivo)
- Centrifuga (capacidade de 2000 x g)
- Vórtex ou equivalente
- Agitador de placas
- Câmara Úmida / Incubadora capaz de manter uma temperatura de +37°C (±3°C)
- Tubos para a imersão do tecido de fragmento de orelha

Precauções e Advertências

- Manipular todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- Usar luvas de proteção/vestuário/olhos ou o rosto de proteção ao manusear amostras e reagentes.
- Consultar o Ficha de Segurança produto para informações adicionais.
- Ver no final do protocolo para os perigos e medidas de prevenção relacionados com os reagentes.

Práticas laboratoriais

- Resultados ótimos serão obtidos seguindo rigorosamente o protocolo deste teste. Pipetagem cuidadosa, observação dos tempos de incubação e lavagens corretas durante todo o procedimento são necessários para manter a precisão e acurácia. Usar uma ponteira diferente para cada amostra e controle.
- Não expor a solução de TMB à luz forte ou a agentes oxidantes. Manusear a solução de TMB em recipientes limpos de vidro ou plástico.
- Todos os resíduos devem ser descontaminados adequadamente antes do descarte. Descartar os conteúdos de acordo com as normas locais, regionais e nacionais.
- Ter cuidado para evitar a contaminação dos componentes do kit. Não devolver a sobra do reagente ao frasco.
- Não utilizar kits com prazo de validade vencido.

Preparação dos reagentes

Solução de Lavagem

O Concentrado de Lavagem (10X) deve ser trazido à 18–26°C e homogeneizado para permitir a dissolução de qualquer sal precipitado. O Concentrado de Lavagem deve ser diluído 1:10 em água destilada ou deionizada antes do uso (por exemplo, 30 ml de concentrado mais 270 ml de água por placa a ser testada). Quando a Solução de Lavagem é preparada em condições estéreis, pode ser armazenada durante uma semana a temperatura entre 2–8°C.

Preparo das amostras

Soro fresco ou congelado, plasma, sangue total ou tecido de fragmento de orelha podem ser testados.

Amostras de tecidos de fragmento de orelha

- Use amostras de fragmento de orelha de 2–3 mm de diâmetro (por exemplo: recolhidos por meio de aplicação de brinco com dispositivo de entalhe de orelha anexado).
- Quando aplicável, amostras de fragmento de orelha podem permanecer no dispositivo de coleta para incubação. **Nota:** amostras frescas, úmidas, dissecadas ou congeladas de fragmento de orelha podem ser testadas entre 12 e 24 horas à 18–26°C.
- Adicione 150–250 μ l do tampão de imersão de fragmento da orelha para cada fragmento de orelha. Assegure-se de que a amostra de tecido esteja totalmente coberta com a solução (homogenize suavemente).
- Permita que as amostras fiquem imersas no tampão por 12 a 24 horas à 18–26°C ou nos finais de semana até 72 horas a 18–26°C (ou a 2–8°C). A fim de evitar a evaporação, recomenda-se incubar os tubos selados ou em câmara úmida.
- Aspirar 50 μ l do tampão para teste. **Nota:** O tampão remanescente pode ser separado da amostra de tecido de fragmento de orelha e estocado congelado (-20°C) para teste futuro ou para reteste.

Procedimento de Teste

Todos os reagentes devem ser mantidos a 18–26°C antes da utilização. Misturar reagentes invertendo suavemente ou realizando movimentos circulares.

- 1 Obter a(s) placa(s) impregnada(s) e anote a posição da amostra. Se utilizar parcialmente as placas, remova apenas as cavidades suficientes para as amostras a serem testadas. Guarde as cavidades remanescentes com o dissecante no saco ziplock fornecido adicionalmente e armazene entre 2–8°C.

- 2 Adicionar 50 µl de Anticorpos de Detecção em cada cavidade.

- 3 Adicionar 50 µl de Controle Negativo (CN) nas cavidades apropriadas.

- 4 Adicionar 50 µl de Controle Positivo (CP) nas cavidades apropriadas.

- 5 Adicionar 50 µl das amostras nas cavidades remanescentes.

- 6 Homogenizar o conteúdo das cavidades agitando levemente a placa ou usando um agitador de placas.

- 7 Incubar por 2 horas (\pm 5 min.) à 37°C (\pm 3°C) ou por toda a noite (12–18 horas) à 2–8°C. Para qualquer opção de incubação, as placas devem ser seladas firmemente para evitar evaporação ou incubadas com coberturas de placa em câmara úmida.

- 8 Remover o conteúdo líquido das cavidades da placa e lavar cada cavidade com aproximadamente 300 µl de Solução de Lavagem por 5 vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens e antes da adição adicionar o próximo reagente. Após a lavagem final, remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente. **Importante!** Controlar cuidadosamente para que não restem traços de sangue nas paredes ou cantos das cavidades. 2 a 3 lavagens adicionais podem ser necessárias para remoção do sangue antes de se proceder ao próximo passo.

- 9 Adicionar 100 µl de Conjugado em cada cavidade.

- 10 Incubar por 30 minutos (\pm 2 min.) à 18–26°C.

- 11 Repetir o passo 8.

- 12 Adicionar 100 µl de Substrato TMB No.12 em cada cavidade.

- 13 Incubar por 10 minutos (\pm 1 min.) à 18–26°C.

- 14 Adicionar 100 µl de Solução de Interrupção No.3 em cada cavidade.

- 15 Medir e anotar a absorbância das amostras e controles a 450 nm, ou em duplo comprimento de onda de 450 nm e 650 nm.

16 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Critérios de Validade

$$CN\bar{x} \leq 0,250$$

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq 0,150$$

Para testes inválidos, deve-se suspeitar da técnica, e o teste deve ser repetido após a revisão cuidadosa do protocolo do produto. **Nota:** IDEXX têm instrumentos e software disponíveis para o cálculo das médias, razões e elaboração de resumo de dados.

Amostras

$$A - N = \text{Amostra } A(450) - CN\bar{x}$$

A presença ou ausência de antígenos contra BVDV na amostra é determinada pelo cálculo do valor da DO corrigido (A - N) para cada amostra.

17 Interpretação:

Amostras de soro, plasma e sangue total

Negativas

$$A - N \leq 0,300$$

Positivas

$$A - N > 0,300$$

Resultados **positivos** nessa prova são válidos para bezerros de qualquer idade. Altos títulos de anticorpos maternos circulantes podem interferir com a detecção de antígenos do BVDV em bezerros jovens. A detecção do antígeno do BVDV em soro, plasma e sangue total pode ser menos sensível depois da ingestão de colostro. Resultados “falso-negativos” podem ocorrer após a ingestão de colostro (“lacuna diagnóstica”). Para excluir a influência dos anticorpos colostrais, recomenda-se testar os bezerros antes da ingestão do colostro. Os resultados negativos obtidos em bezerros após ingestão de colostro devem ser confirmados retestando os bezerros com mais de 30 dias de idade. Consulte a regulamentação de seu país caso seja diferente dessa indicação.

Amostras de tecido de fragmento de orelha

Negativas

$$A - N \leq 0,200$$

Suspeitas

$$0,200 < A - N \leq 0,300$$

Positivas

$$A - N > 0,300$$

Amostras **suspeitas** devem ser testadas novamente usando outros 50 μ l do mesmo tampão. Se houver menos de 50 μ l remanescente, o reteste pode ser feito mergulhando a mesma amostra de tecido de fragmento de orelha novamente (ver “Preparo das amostras”). Se as amostras forem suspeitas novamente, uma amostra de sangue deve ser coletada e testada com o ELISA da IDEXX para BVDV Ag/soro Plus, IV ou PCR para BVDV. Se houver qualquer dúvida quanto à situação de um animal positivo e de alto valor, retestar outra amostra coletada 7–14 dias após a amostra inicial para confirmar infecção persistente. Recomendase que resultados positivos obtidos com sangue total devem ser confirmados usando-se soro ou plasma do mesmo animal. Quando se analisam amostras de fragmento de orelha, a lacuna diagnóstica é inexistente.

Para assistência técnica:

IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contate o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: idexx.com/contactipd

PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.

Licenciado no MAPA sob nº 6.389/1998.

REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL

IDEXX BRASIL LABORATÓRIOS LTDA. Cotia-SP

R. Santa Clara, nº 236, Parque Ind. San José

CEP: 06715-867, CNPJ: 00.377.455/0001-20

Resp.Tec.: Andrea L.C.Frezza CRMV-SP: 30.632

IDEXX e Test With Confidence são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories Inc. ou de suas filiais nos Estados Unidos e/ou em outros países.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

Kit para la detección de Antígeno del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV)/Suero Plus

Para uso veterinario exclusivo

Nombre y uso propuesto

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de antígeno del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) a partir de muestras de suero, de plasma, de sangre entera o de tejidos de muesca de oreja de bovino.

Información general

El Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV), el Virus de la Enfermedad de la Frontera (Border Disease, BDV) y el Virus de la Peste Porcina Clásica (CSFV) pertenecen al género Pestivirus, de la familia Flaviviridae. El BVDV es uno de los virus más patógenos de la especie bovina y causa pérdidas considerables en la ganadería de vacuno de leche y carne en todo el mundo. Los síntomas típicos de la infección por BVDV son diarrea, fiebre, seguida de un descenso en la producción lechera. Su efecto de inmunosupresión puede potenciar infecciones por otros microorganismos. El virus puede atravesar la barrera placentaria en vacas gestantes infectadas, comportando pérdidas reproductivas debidas a abortos, terneros nacidos muertos o de muerte precoz. Algunos de los terneros que sobreviven son inmunotolerantes y excretan grandes cantidades de virus infecciosos durante el resto de su vida. Es importante identificar las crías “portadoras” para interrumpir el ciclo de infecciones en los rebaños. Estos animales portadores suelen morir de la Enfermedad de las Mucosas durante los primeros dos años de vida. Debido a la infección en el útero, el virus BVDV es un contaminante frecuente de productos biológicos tales como vacunas y medicamentos. El virus de la Border Disease o Enfermedad de la Frontera (BDV) produce una enfermedad similar en las ovejas, mientras que el de la peste porcina clásica (CSFV), provoca serias pérdidas económicas por su alta patogenicidad y por causar tasas de mortalidad muy altas.

Descripción y principios

IDEXX BVDV–Ag/Suero Plus es un inmunoensayo enzimático diseñado para detectar antígenos (Ag) en suero, plasma, sangre entera y tejido de muesca de oreja de bovinos. Se ha configurado un formato de placas de microtitulación tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos de BVDV (Erns). El antígeno del BVDV de la muestra es capturado en las placas. Tras incubación de la muestra en el pocillo, el antígeno es detectado por anticuerpos específicos y un conjugado de peroxidasa de rábano picante. Después se elimina mediante lavado el conjugado no unido y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia del enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno, generando una coloración azul. Al añadir la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro. El valor de la densidad óptica (DO) corregida de las muestras se calcula usando la absorbancia obtenida con la muestra del ensayo y corregida con la absorbancia del control negativo.

| Reactivos | | Volumen | | |
|--|--|------------|------------|------------|
| 1 | Placa tapizada con Ac monoclonales anti-ERns | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Control Positivo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Control Negativo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Conjugado | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Solución Tampón para muesca de oreja | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | Substrato TMB n.º12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Solución de Frenado n.º3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Solución de Lavado Concentrada (10X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Solución de Detección | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Otros componentes: Bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable | | 1 | 1 | – |

Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas del kit.

Almacenamiento

Almacenar los reactivos a 2–8°C. Los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando hayan sido almacenados en las condiciones correctas.

Materiales necesarios que no se suministran

- Micropipetas de precisión y micropipetas multidispensadoras
- Puntas de pipeta desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 450 nm o 450/650 nm)
- Lavador de placas, manual, semiautomático o automático
- Usar sólo agua destilada o desionizada para preparar los reactivos de la prueba
- Cubiertas de placas (tapa, papel de aluminio o adhesivo, etc)
- Centrifuga (2000 x g)
- Vortex o equivalente
- Agitador de placas
- Cámara húmeda o incubadora a +37°C (±3°C)
- Tubos para la inmersión del tejido de muesca de oreja

Precauciones y advertencias

- Considerar todo material biológico como potencialmente infeccioso cuando se manipule.
- Usar guantes de protección / prendas de protección / gafas o protección de la cara al manipular muestras y reactivos.
- Consultar la Ficha de Datos de Seguridad de Materiales del producto para obtener información adicional.
- Consultar al final de este protocolo para los peligros y medidas de prevención relacionados con los reactivos.

Prácticas de laboratorio

- Los resultados óptimos se obtendrán siguiendo estrictamente este protocolo. El pipeteo cuidadoso, la coordinación y el lavado durante todo este procedimiento son necesarios para mantener la precisión y exactitud. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra y control.
- No exponer las soluciones TMB a la luz fuerte o a cualquier agente oxidante. Manejar el Substrato TMB con material de cristal limpio o material plástico.
- Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de ser eliminados. Desechar el contenido de conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Extremar la precaución para evitar la contaminación de los componentes del kit. No verter los reactivos no utilizados de nuevo en contenedores.
- No utilizar los kits pasada su fecha de caducidad.

Preparación de los reactivos

Solución de Lavado

La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe dejarse que adquiera 18–26°C y agitarse para asegurar la disolución de posibles sales precipitadas. Esta solución deberá diluirse 1/10 con agua destilada/ desionizada antes de emplearla (por ej., 30 ml Solución de Lavado Concentrada (10X) más 270 ml de agua por placa a analizar). Preparándose en condiciones estériles, la Solución de Lavado puede almacenarse durante una semana a 2–8°C

Preparación de las muestras

Pueden analizarse muestras frescas o congeladas de suero, plasma, sangre entera o muesca de oreja.

Muestras de muesca de oreja

- Utilizar recipientes para la muesca de la oreja (muestras) de unos 2–3 mm de diámetro (por ejemplo tome la muestra cuando se apliquen en la oreja los córtales, provistos de un dispositivo para la toma de muestra).
- Cuando aplicable, las muestras de tejido de muesca de oreja pueden permanecer en el dispositivo de muestreo para su incubación. **Nota:** pueden analizarse muestras de tejido de muesca de oreja frescas, húmedas, desecadas o congeladas.
- Añadir 150–250 μ l de Solución Tampón (buffer) para sumergir la muesca de oreja. Asegúrese de que toda la muestra quede cubierta por la solución (sacudir con cuidado o agitar).
- Dejar las muestras sumergidas entre 12 y 24 horas a 18–26°C o durante el fin de semana hasta 72 horas a 18–26°C (o a 2–8°C). Para evitar evaporación, incubar los tubos sellados o incubar en una cámara húmeda.
- Aspirar los 50 μ l de la solución necesarios para realizar el análisis. **Nota:** la solución restante puede separarse del tejido de la muesca de oreja y conservarse congelada (–20°C) para pruebas posteriores o si se necesita repetir la prueba.

Procedimiento de la Prueba

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran 18–26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos suavemente.

- 1 Tomar la placa(s) tapizada(s) y marcar la posición de la muestra. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los pocillos necesarios para analizar las muestras. Guardar el resto de pocillos, junto con el desecante, en la bolsa de plástico de cierre hermético reutilizable y volver a almacenar a 2–8°C.

- 2 Añadir 50 µl de la Solución de Detección en cada pocillo.

- 3 Añadir 50 µl de Control Negativo (CN) en los pocillos apropiados.

- 4 Añadir 50 µl de Control Positivo (CP) en los pocillos apropiados.

- 5 Añadir 50 µl de muestra en los pocillos restantes.

- 6 Mezclar el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa o usar un agitador de placas.

- 7 Incubar durante 2 horas (±5 min.) a 37°C (±3°C) o toda la noche (12–18 horas) a 2–8°C. En cualquier opción de incubación, las placas deben sellarse firmemente para evitar evaporaciones, o incubarse con cubiertas en una cámara húmeda.

- 8 Eliminar el contenido líquido de cada pocillo y lave cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado 5 veces. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente. Después del lavado final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. **Importante!** Controle cuidadosamente que no queden rastros de sangre en las paredes o bordes de los pocillos. Para eliminar la sangre antes de pasar a la siguiente fase puede ser necesario realizar 2 ó 3 lavados más.

- 9 Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pocillo.

- 10 Incubar durante 30 minutos (±2 min.) a 18–26°C.

- 11 Repetir el paso 8.

- 12 Dispensar 100 µl de Substrato TMB n.º12 en cada pocillo.

- 13 Incubar 10 minutos (±1 min.) a 18–26°C.

- 14 Dispensar 100 µl de Solución de Frenado n.º3 en cada pocillo.

- 15 Medir y anotar la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm o usando doble longitud de onda, a 450 nm y 650 nm.

16 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Criterios de Validación

$$CN\bar{x} \leq 0,250$$

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq 0,150$$

En los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica, y el ensayo tiene que repetirse siguiendo una revisión meticulosa del protocolo suministrado con el producto. **Nota:** IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y diferencias M-N, y la elaboración de resúmenes de datos.

Muestras

$$M - N = \text{Muestra A(450)} - CN\bar{x}$$

La presencia o ausencia de antígenos de BVDV en la muestra se determina mediante el valor de la densidad óptica corregida (M-N) de cada muestra.

17 Interpretación:

Muestras de suero, plasma o sangre entera

Negativas

Positivas

$$M - N \leq 0,300$$

$$M - N > 0,300$$

Los resultados **positivos** para esta prueba son válidos para terneros de cualquier edad. Sin embargo, titulaciones elevadas de anticuerpos maternos pueden interferir con la detección del antígeno de BVDV en terneros. La detección de antígeno de BVDV en muestras de suero, plasma o sangre entera puede ser menos sensible después de la ingesta de anticuerpos por el calostro. Pueden darse resultados “falso–negativos” después de la toma de calostro (“laguna diagnóstica”). Para excluir la influencia de los anticuerpos del calostro, se recomienda realizar el análisis en los terneros antes de la toma del calostro. Los resultados negativos obtenidos en terneros después de la toma del calostro deben de confirmarse repitiendo el análisis cuando los terneros tengan una edad de más de 30 días. Referirse a la regulación nacional si ésta difiere de estas indicaciones

Muestras de muesca de oreja

Negativas

Dudosas

Positivas

$$M - N \leq 0,200$$

$$0,200 < M - N \leq 0,300$$

$$M - N > 0,300$$

Las muestras **dudosas** deben de analizarse de nuevo usando otros 50 μ l de la misma solución tamponada donde se sumergió la muestra de muesca de oreja. Si hubiera menos de 50 μ l disponibles de dicha solución, el nuevo análisis puede realizarse sumergiendo de nuevo la muestra de tejido de muesca de la oreja (ver “Preparación de las Muestras”). Si la muestra vuelve a resultar dudosa, se debe tomar una muestra de sangre que debe analizarse con el kit ELISA IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, mediante aislamiento del virus (μ l) o con PCR para BVDV. Si hubiera alguna duda sobre el estado de un animal vivo positivo que se considere valioso, para la confirmación de una infección persistente se debe realizar un nuevo análisis con otra muestra obtenida entre 7 y 14 días después de haberse tomado la primera muestra. Recomendamos que los resultados positivos obtenidos con sangre entera se confirmen empleando suero o plasma del mismo animal. Cuando se analizan muestras de tejido de muesca de oreja la laguna diagnóstica es inexistente.

Para asistencia técnica:

IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte al representante local o distribuidor IDEXX o visite: idexx.com/contactlpd

N.º de Registro: 0744-RD

IDEXX y Test With Confidence son marcas o marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. o sus filiales en los Estados Unidos de América y/o en otros países.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Testkit zum Nachweis von Antigen des Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV)/Serum Plus

Gebrauchsinformation. In-vitro-Diagnostikum. Nur zum tierärztlichen Gebrauch

Name und Verwendungszweck

Der IDEXX BVDV Ag/Serum Plus ist ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von spezifischem Antigen des Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV) in Serum, Plasma, Vollblut und Ohrgewebe-Stanzproben von Rindern.

Allgemeine Informationen

Das Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV), das Border Disease Virus (BDV) und das Virus der Klassischen Schweinepest (CSFV) gehören zum Genus Pestivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae. Das BVDV ist eines der wichtigsten pathogenen Viren beim Rind und führt weltweit zu beträchtlichen Verlusten in der Rinder- und Milchproduktion. Die typischen Symptome einer BVDV Infektion sind Durchfall, Fieber und Rückgang der Milchproduktion. Aufgrund der immunsupprimierenden Wirkung des BVDV können prädisponierte Tiere an Infektionen mit anderen Mikroorganismen erkranken. Die BVDV Infektion ist gekennzeichnet durch eine hohe Morbidität, jedoch eine geringe Mortalität. Die Infektion tragender Kühe kann zu einer transplazentalen Infektion des Fötus führen. Je nach Trächtigkeitsstadium können Föten abortiert, tot, oder mit schweren Anomalien geboren werden. Eine Infektion von Föten im immuntoleranten Stadium führt häufig zur Geburt klinisch zunächst gesunder, jedoch persistent virämischer Kälber, die lebenslang das Virus ausscheiden. Es ist wichtig, diese Virämiker zu identifizieren und aus dem Bestand zu entfernen, um den Infektionszyklus zu unterbrechen. Viele dieser persistierenden Virämiker sterben in den ersten zwei Lebensjahren an "Mucosal Disease". Aufgrund der intrauterinen Infektion, ist BVDV eine häufig vorkommende Kontaminante von biologischen Produkten wie Vakzinen und Pharmazeutika. BDV kann ähnliche Erkrankungen beim Schaf hervorrufen, während hochpathogene CSFV-Stämme in der Schweineproduktion schwere Verluste mit hoher Mortalität verursachen können.

Beschreibung des Testprinzips

Der IDEXX BVDV Ag/Serum Plus ist ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von spezifischem Antigen des Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV) in Serum, Plasma, Vollblut und Ohrgewebe-Stanzproben von Rindern. Es wurde ein Mikrotiterformat entwickelt, bei dem spezifische monoklonale Antikörper gegen BVDV (E^m) in den Plattenvertiefungen immobilisiert wurden. Dadurch wird in der Probe vorhandenes BVDV Antigen an die Platte gebunden. Nach der Probeninkubation wird gebundenes BVDV Ag durch spezifische Antikörper und ein Meerrettich-Peroxydase-Konjugat nachgewiesen. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen weggespült und eine Substrat/Chromogen-Lösung hinzugegeben, die mit der Meerrettich-Peroxydase reagiert. Bei Vorhandensein des Enzyms kommt es zu einer Farbreaktion. Durch Zugabe der Stopplösung kommt es zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbreaktion wird mit einem Photometer gemessen. Das Ergebnis wird berechnet, indem der OD-Wert der Probe (P) um den OD-Wert der negativen Kontrolle (NK) korrigiert wird.

| Reagenzien | | Menge | | |
|--|---|------------|------------|------------|
| 1 | Mit Anti-E ^{tns} mAk beschichtete Testplatte (inaktiviert) | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Positive Kontrolle | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Negative Kontrolle | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Konjugat | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Puffer für Ohrgewebe-Stanzproben | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | TMB-Substrat Nr.12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Stopplösung Nr.3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Waschkonzentrat (10X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Detektorlösung | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Sonstige Komponenten: Wiederverwendbarer Druckverschlussbeutel. | | 1 | 1 | — |

Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

Lagerung

Reagenzien bei 2–8°C lagern. Bei entsprechender Lagerung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum stabil.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Graduierter Zylinder für die Waschlösung
- Photometer (für 96 Vertiefungen, ausgestattet mit 450 nm oder 450 und 650 nm Messfiltern)
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu- Folie oder Klebefolie)
- Zentrifuge (2000 x g)
- Vortex-Mischer oder gleichwertiger Mischer
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Feuchte Kammer / Inkubator für eine konstante Temperatur von +37°C (±3°C)
- Röhrchen für die Inkubation von Ohrgewebe-Stanzproben

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Alle biologischen Substanzen als potenziell infektiös behandeln.
- Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz oder Gesichtsschutz beim Umgang mit Proben und Reagenzien verwenden.
- Weitere Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten.
- Nähere Informationen zur Reagenziensicherheit und Vorsichtsmaßnahmen befinden sich am Ende der Gebrauchsinformation.

Laborpraktiken

- Bei strikter Einhaltung dieser Anweisungen werden optimale Ergebnisse erzielt. Sorgfältiges Pipettieren und Waschen und eine genaue Zeiteinteilung während der Testdurchführung sind notwendig, um die Genauigkeit der Werte zu gewährleisten. Für jede Probe und Kontrolle eine neue Pipettenspitze benutzen.
- Substrat nicht starkem Licht oder oxidierenden Mitteln aussetzen. Nur saubere Glas- oder Plastikbehälter benutzen.
- Alle Abfälle vor der Entsorgung ordnungsgemäß dekontaminieren. Den Inhalt im Einklang mit den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Eine Verunreinigung der Bestandteile des Testkits sorgfältig vermeiden. Keine unbenutzten Reagenzien zurück in die Originalflaschen schütten.
- Die Bestandteile nicht nach Ablauf des Verfalldatums benutzen.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung

Das Waschkonzentrat auf 18–26°C bringen und mischen, um ausgefallene Salze aufzulösen. Herstellung der Waschlösung aus dem Waschkonzentrat (10X): 1 Teil Waschkonzentrat (10X) mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnen. Bei steriler Zubereitung kann die Waschlösung eine Woche bei 2–8°C aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Proben

Es können Serum-, Plasma-, Vollblutproben und Ohrgewebe-Stanzproben untersucht werden.

Ohrgewebe-Stanzproben

- Ohrgewebe-Stanzproben von ca. 2–3 mm Durchmesser verwenden (solche Proben können z.B. bei der Verwendung von Ohrmarkensystemen mit integriertem Probensammler gewonnen werden).
- Falls möglich kann die Gewebeprobe mit dem Puffer im Probensammelgefäß inkubiert werden. **Hinweis:** Es können frische, feuchte, getrocknete oder gefrorene Ohrgewebe-Stanzproben getestet werden.
- 150–250 µl Puffer für Ohrgewebe-Stanzproben zu den Ohrgewebeproben hinzugeben. Dabei ist darauf zu achten, dass die Ohrgewebeprobe vollständig mit Puffer bedeckt ist (dies kann durch leichtes Schütteln des Reaktionsgefäßes erreicht werden).
- Die Gewebeprobe im Puffer 12 bis 24 Stunden bei 18–26°C oder über das Wochenende für bis zu 72 Stunden bei 18–26°C (oder bei 2–8°C) inkubieren. Zur Vermeidung von Verdunstung wird die Inkubation im verschlossenen Röhrchen oder einer feuchten Kammer empfohlen.
- Mittels Pipette 50 µl des Puffers zur Untersuchung auf BVDV entnehmen. **Hinweis:** Der restliche Puffer kann von der Gewebeprobe separiert und bei -20°C für spätere Untersuchungen oder Nachuntersuchungen gelagert werden.

Testanweisung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen.

- 1 Die beschichteten Platten nehmen und die Position der Proben notieren. Falls nur ein Teil der Platte verwendet wird, die notwendige Menge an Vertiefungen entnehmen und den Rest der Platte mit dem Trockenmittel in dem mitgelieferten Plastikbeutel bei 2–8°C zurückstellen.

- 2 50 µl der Detektorlösung in jede Vertiefung geben.

- 3 50 µl negative Kontrolle (NK) in die entsprechenden Vertiefungen geben.

- 4 50 µl positive Kontrolle (PK) in die entsprechenden Vertiefungen geben.

- 5 50 µl der Proben in die für die Proben vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.

- 6 Den Inhalt der Vertiefungen durch vorsichtiges Klopfen an die Seiten der Platte oder durch Schütteln der Platten auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.

- 7 Die Mikrotiterplatten sorgfältig abgedeckt in einer feuchten Kammer 2 Stunden (\pm 5 Min.) bei 37°C (\pm 3°C) oder über Nacht (12–18 Stunden) bei 2–8°C inkubieren. In jedem Fall sollten die Testplatten entweder hermetisch verschlossen inkubiert werden oder abgedeckt in einer feuchten Kammer.

- 8 Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen absaugen und sodann mit etwa 300 µl Waschlösung 5-mal waschen. Dabei ein Austrocknen der Platte zwischen den Waschschrritten und der Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden. Nach dem letzten Waschen die Platte auf saugfähigem Material ausklopfen, um verbleibende Restflüssigkeit zu entfernen. **Hinweis:** Es muss sichergestellt sein, dass keine Reste von Blut in den Vertiefungen verbleiben. Zum Entfernen der Blutreste können 2–3 zusätzliche Waschzyklen notwendig sein, danach laut Testanweisung fortfahren.

- 9 100 µl Konjugat in jede Vertiefung geben.

- 10 30 Minuten (\pm 2 Min.) bei 18 -26°C inkubieren.

- 11 Schritt 8 wiederholen.

- 12 100 µl TMB-Substrat Nr.12 in jede Vertiefung geben.

- 13 10 Minuten (\pm 1 Min.) bei 18 -26°C inkubieren.

- 14 100 µl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung geben.

- 15 Extinktionswerte bei 450 nm (oder für duale Wellenlänge bei 450 und 650 nm) messen und Werte notieren.

16 Berechnungen:

Kontrollen

$$NK\bar{x} = \frac{NK1 A(450) + NK2 A(450)}{2}$$

$$PK\bar{x} = \frac{PK1 A(450) + PK2 A(450)}{2}$$

Validitätskriterien

$$NK\bar{x} \leq 0,250$$

$$PK\bar{x} - NK\bar{x} \geq 0,150$$

Ungültige Ergebnisse sind möglicherweise auf eine nicht sachgemäße Durchführung zurückzuführen. Der Test sollte nach erneutem, sorgfältigem Durchlesen der Gebrauchsinformation wiederholt werden. **Hinweis:** IDEXX bietet auch Instrumente und Software zur Berechnung der Mittel- und Prozentwerte an.

Proben

$$P - NK = \text{Probe A(450)} - NK\bar{x}$$

Das Vorhandensein oder Fehlen von BVDV-Antigen wird festgestellt, indem man den korrigierten OD-Wert der Probe (P-NK) ermittelt.

17 Interpretation:

Serum-, Plasma- und Vollblutproben

Negativ

$$P - NK \leq 0,300$$

Positiv

$$P - NK > 0,300$$

Positive Ergebnisse sind gültig für Kälber jeden Alters. Hohe Titer zirkulierender, maternaler Antikörper bei jungen Tieren können mit dem Nachweis von BVDV-Antigen in Serum, Plasma und Vollblut interferieren, wodurch der Test unter Umständen weniger sensitiv ist und zu falsch negativen Ergebnissen führen kann ("Diagnostische Lücke"). Negative Befunde von postkolostral beprobten Kälbern sind daher durch eine Nachuntersuchung im Alter von mehr als 30 Tagen¹ abzusichern.

¹ gültig für Deutschland nach der "Amtlichen Methodensammlung für die Untersuchung der Bovinen Virusdiarrhoe". Die Bestimmungen in anderen Ländern können abweichen.

Ohrgewebe-Stanzproben

Negativ

$$P - NK \leq 0,200$$

Fraglich

$$0,200 < P - NK \leq 0,300$$

Positiv

$$P - NK > 0,300$$

Fragliche Proben können nachuntersucht werden, indem nochmals 50 µl des auf dem Ohrgewebestück verbliebenen Puffers getestet werden. Falls die auf dem Ohrgewebestück verbliebene Menge Puffer nicht ausreicht, kann das Gewebestück nochmals mit Puffer für Ohrgewebe-Stanzproben inkubiert werden (siehe unter "Vorbereitung der Proben"). Falls die Probe dann wieder fraglich reagiert, sollte von dem Tier eine Blutprobe entnommen werden und mittels IDEXX BVDV Ag/Serum Plus, Virusisolierung oder PCR auf BVDV untersucht werden. Der Test erfaßt im Allgemeinen immunkompetente, transient infizierte Tiere nicht. Im Zweifelsfall sollten positive Tiere nach 7–14 Tagen nochmals untersucht werden. Positive Ergebnisse mit Vollblutproben sollten bestätigt werden, indem Serum oder Plasma vom gleichen Tier untersucht wird. Bei der Untersuchung von Ohrstanzproben ist die diagnostische Lücke nicht vorhanden.

Technische Unterstützung:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 oder +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite:

idexx.com/contactlpd

Zul.-Nr.: BGVV-B 230

IDEXX und Test With Confidence sind Schutzmarken oder eingetragene Schutzmarken von IDEXX Laboratories, Inc. oder eines Tochterunternehmens von IDEXX in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Test per la ricerca dell'antigene del virus della diarrea virale bovina (BVDV)/Siero Plus

Esclusivamente per uso veterinario.

Nome del prodotto e utilizzo

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus è un esame immunoenzimatico di IDEXX per il rilevamento degli antigeni del BVDV nel siero, nel plasma e nel sangue intero e in campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch) dei bovini.

Informazioni generali

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV), il virus della border disease (BDV) e il virus del colera suino (virus della peste suina classica, CSFV) sono i tre virus del genere Pestivirus appartenenti alla famiglia dei Flaviviridae. Il BVDV è uno dei più importanti virus patogeni del bovino e causa perdite economiche considerevoli nel settore dell'allevamento dei bovini da latte e da carne di tutto il mondo. I sintomi tipici dell'infezione da BVDV includono diarrea e febbre seguite da un calo della produzione di latte. L'effetto immunosoppressivo del BVDV è in grado di potenziare l'infezione da parte di altri microrganismi. Il virus attraversa la placenta dei bovini gravidi infetti, causando perdite dovute ad aborti, alla nascita di vitelli morti o alla morte precoce dei vitelli neonati. Alcuni vitelli che sopravvivono diventano immunotolleranti nei confronti del virus; questi animali eliminano notevoli quantità di virus infettanti per tutta la vita. È importante identificare questi soggetti permanentemente infetti per interrompere il ciclo dell'infezione nella mandria. Gli animali permanentemente infetti spesso muoiono a causa della malattia delle mucose entro i primi due anni di età. A causa della possibilità di infezione nell'utero, il BVDV è un comune contaminante di prodotti farmaceutici biologici, come i vaccini o i farmaci. Il BDV causa simili sindromi anche nella pecora, mentre il CSFV provoca delle gravi perdite nel settore dell'allevamento suino, poiché è altamente patogeno e può causare un'elevata mortalità.

Descrizione e principi del test

IDEXX BVDV-Ag/Siero Plus è un esame immunoenzimatico studiato per il rilevamento degli antigeni (Ag) del BVDV nel siero, nel plasma e nel sangue intero e in campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch) dei bovini. È stato ideato un formato basato sulla microtitolazione mediante l'immobilizzazione di anticorpi monoclonali specifici contro il BVDV (E^{ns}) sulle piastre. L'antigene del BVDV presente nel campione viene catturato sulle piastre. Dopo l'incubazione nel pozzetto del campione da analizzare, l'antigene del BVDV catturato viene rilevato da anticorpi specifici e da un coniugato di perossidasi di rafano. A questo punto il coniugato non legato viene lavato via e viene aggiunta una soluzione di substrato/cromogeno. In presenza dell'enzima, il substrato viene convertito in un prodotto che reagisce con il cromogeno, generando un colore blu. Quando viene aggiunta la soluzione di arresto, compare un colore giallo. L'assorbanza viene misurata con uno spettrofotometro. Il valore di densità ottica corretto dei campioni viene calcolato utilizzando l'assorbanza ottenuta con il campione e correggendola in base all'assorbanza del controllo negativo.

| Reagenti | | Volume | | |
|---|--|------------|------------|------------|
| 1 | Piastra rivestita di anticorpi monoclonali anti-ERns | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Controllo positivo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 3 | Controllo negativo | 1 x 1,6 ml | 1 x 2,0 ml | 1 x 6,5 ml |
| 4 | Coniugato di perossidasi di rafano (HRPO) | 1 x 25 ml | 1 x 60 ml | 1 x 350 ml |
| 5 | Soluzione tampone (ear notch) | 1 x 80 ml | 2 x 80 ml | 2 x 480 ml |
| A | Substrato TMB N.12 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| B | Soluzione di arresto N.3 | 1 x 20 ml | 1 x 60 ml | 1 x 400 ml |
| C | Soluzione di lavaggio concentrata (10X) | 1 x 125 ml | 1 x 480 ml | 3 x 480 ml |
| D | Anticorpi per il rilevamento | 1 x 15 ml | 1 x 30 ml | 1 x 180 ml |
| Altri componenti: sacchetto riutilizzabile con chiusura a pressione zip lock | | 1 | 1 | — |

Nota: vedere la tabella alla fine dell'inserito tecnico per la descrizione dei simboli usati nell'inserito e nelle etichette.

Conservazione

Conservare i reagenti a una temperatura di 2–8°C. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza a condizione che siano stati conservati correttamente.

Materiali necessari non forniti

- Pipette di precisione o pipette multicanale idonee all'erogazione
- Puntali per pipette monouso
- Cilindro graduato per la soluzione di lavaggio
- Lettore per piastre da 96 pozzetti (dotato di filtro da 450 nm o da 450/650 nm)
- Sistema di lavaggio per piastre (manuale, semi-automatico o automatico)
- Usare solo acqua distillata o deionizzata per la preparazione dei reagenti
- Copripiastro o sigillante per piastre (coperchio, foglio di alluminio o adesivo)
- Centrifuga (2000 x g)
- Vortex o simile
- Agitatore per piastre
- Camera umida/ Incubatore in grado di mantenere una temperatura di +37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)
- Provette per l'immersione dei campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch)

Precauzioni e avvertenze per gli utenti

- Maneggiare tutti i materiali biologici come potenzialmente infettivi.
- Indossare guanti protettivi/abbigliamento protettivo/protezione per viso e occhi.
- Fare riferimento alla scheda di sicurezza MSDS del prodotto per maggiori informazioni.
- Vedere la fine dell'inserito tecnico per le indicazioni di pericolo e i consigli sulla prudenza.

Pratiche di laboratorio

- La stretta osservanza di questo protocollo permette di ottenere risultati ottimali. È necessario eseguire con attenzione la pipettatura e il lavaggio per tutta la durata di questa procedura al fine di garantire precisione e accuratezza. Utilizzare un puntale per pipetta diverso per ogni campione e controllo.
- Non esporre la soluzione TMB a luce intensa o ad agenti ossidanti. Maneggiare la soluzione TMB con guanti puliti o strumenti in plastica.
- Tutti i rifiuti devono essere correttamente decontaminati prima dello smaltimento. Smaltire il contenuto in accordo con le normative locali, regionali e nazionali.
- Fare attenzione per evitare la contaminazione dei componenti del kit. Non riversare nei loro contenitori i reagenti inutilizzati.
- Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio

Lasciare che la soluzione di lavaggio concentrata (10X) raggiunga una temperatura di 18–26°C e miscelarla per assicurare la dissoluzione degli eventuali sali precipitati. Prima dell'uso, diluire 1:10 la soluzione di lavaggio concentrata (10X) con acqua distillata o deionizzata (ad esempio, diluire 30 ml di soluzione concentrata (10X) con 270 ml di acqua per ogni piastra da analizzare). Se preparata in condizioni sterili, la soluzione di lavaggio 1X può essere conservata per una settimana a 2–8°C.

Preparazione del campione

È possibile analizzare campioni di siero, plasma e sangue intero freschi o congelati e campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch).

Campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch)

- Utilizzare dei campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch) di 2–3 mm di diametro (ad es., prelevati applicando delle targhette auricolari dotate di un dispositivo di prelievo di campioni auricolari).
- Se rilevante, durante l'incubazione i campioni possono rimanere nel dispositivo di campionamento.
Nota: è possibile analizzare campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch) freschi, bagnati, essiccati o congelati.
- Aggiungere 150–250 μ l di soluzione tampone per l'immersione del campione di tessuto auricolare IDEXX al tessuto del padiglione auricolare (ear notch). Assicurarsi che il campione di tessuto venga completamente ricoperto dalla soluzione, picchiettando o miscelando delicatamente la provetta.
- Lasciare in immersione il campione nella soluzione tampone per 12–24 ore a 18–26 °C o durante il weekend fino a 72 ore a 18–26°C (o a 2–8°C). Al fine di evitare l'evaporazione si consiglia di incubare le provette sigillate oppure all'interno di una camera di umidificazione.
- Aspirare 50 μ l di tampone di immersione per l'analisi. **Nota:** il rimanente tampone di immersione può essere separato dal campione di tessuto del padiglione auricolare (ear notch) e conservato congelato (-20°C) per un'ulteriore futura analisi o per la ripetizione del test.

Protocollo

Prima dell'uso tutti i reagenti devono raggiungere 18–26°C. I reagenti devono essere miscelati mediante centrifugazione delicata o movimenti circolari brevi.

- 1 Prendere le piastre rivestite di antigeni e registrare la posizione dei campioni. Nel caso non si utilizzino tutte le piastre, rimuovere solo i pozzetti sufficienti per l'analisi. Riporre i pozzetti rimanenti nel sacchetto richiudibile, insieme all'essiccate, e riportare a 2–8°C.

- 2 Aggiungere in ciascun pozzetto 50 µl di anticorpi per il rilevamento.

- 3 Aggiungere 50 µl di controllo negativo (CN) nei pozzetti appropriati.

- 4 Aggiungere 50 µl di controllo positivo (CP) nei pozzetti appropriati.

- 5 Aggiungere 50 µl di campione nei rimanenti pozzetti.

- 6 Miscelare il contenuto dei pozzetti picchiettando delicatamente sulla piastra o utilizzare un agitatore per piastre.

- 7 Incubare per 2 ore (± 5 minuti) a 37 °C ($\pm 3^\circ\text{C}$) o per tutta la notte (12–18 ore) a 2–8°C. In entrambi i casi, le piastre devono essere fermamente sigillate o incubate in una camera di umidificazione, usando dei copripiastre per evitare l'evaporazione.

- 8 Rimuovere il contenuto liquido di tutti i pozzetti e lavare ciascun pozzetto con circa 300 µl di soluzione di lavaggio per 5 volte. Evitare di lasciare asciugare la piastra tra un lavaggio e l'altro e prima di aggiungere altro reagente. Dopo l'ultima rimozione, picchiettare con decisione il liquido di lavaggio residuo presente in ciascuna piastra su materiale assorbente. **Importante:** controllare attentamente che non siano rimaste tracce di sangue sulle pareti o lungo i bordi dei pozzetti. Possono essere necessari altri 2–3 lavaggi per rimuovere il sangue prima di procedere al passaggio successivo.

- 9 Erogare 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto.

- 10 Incubare per 30 minuti (± 2 minuti) a 18–26°C.

- 11 Ripetere il passaggio 8.

- 12 Erogare 100 µl di soluzione substrato TMB in ciascun pozzetto.

- 13 Incubare per 10 minuti (± 1 minuto) a 18–26°C.

- 14 Erogare 100 µl di soluzione di arresto in ciascun pozzetto.

- 15 Misurare e registrare l'assorbanza dei campioni e dei controlli a 450 nm o con una lunghezza d'onda doppia di 450 nm e 650 nm.

16 Calcolo:

Controlli

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(450) + CP2 A(450)}{2}$$

Criteri di validità

$$CN\bar{x} \leq 0,250$$

$$CP\bar{x} \geq 0,150$$

$$P\bar{x} - N\bar{x} \geq 0,150$$

Nel caso di esami non validi, la tecnica è da sospettarsi e l'esame deve essere ripetuto seguendo attentamente l'inserito tecnico. **Nota:** IDEXX offre strumenti e software in grado di calcolare le medie e l'C-N e di fornire riepiloghi dei risultati.

Campioni

$$C - N = \text{Campione A(450)} - CN\bar{x}$$

La presenza o l'assenza dell'antigene del BVDV nel campione viene determinata dal valore di OD corretto (C-N) di ciascun campione. Consultare la sezione Calcoli per vedere alcuni esempi.

17 Interpretazione:

Campioni di siero, plasma e sangue intero

Negativi

Positivo

$$C - N \leq 0,300$$

$$C - N > 0,300$$

I risultati **positivi** ottenuti da questo test sono validi per i vitelli di qualsiasi età. Gli elevati titoli di anticorpi materni contro il BVDV presenti in circolo possono interferire con il rilevamento dell'antigene del BVDV in siero, plasma e sangue intero. Il rilevamento dell'antigene del BVDV in campioni di siero, plasma e sangue intero può essere meno sensibile in seguito all'assunzione di anticorpi tramite il colostro. In questi casi possono comparire risultati falsi negativi ("gap diagnostico"). Per escludere l'influenza degli anticorpi del colostro è consigliabile eseguire il test sui vitelli prima dell'assunzione del colostro. I risultati negativi nei vitelli che hanno assunto il colostro devono essere confermati ripetendo il test ad un'età superiore ai 30 giorni. Fare riferimento alle normative del proprio Paese quando queste differiscono dalla descrizione sopra riportata.

Campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch)

Negativi

Sospetto

Positivo

$$C - N \leq 0,200$$

$$0,200 < C - N \leq 0,300$$

$$C - N > 0,300$$

I campioni **sospetti** devono essere rianalizzati utilizzando altri 50 μ l dello stesso tampone di immersione. Se fosse disponibile solo una quantità inferiore a 50 μ l, il test può essere ripetuto immergendo una seconda volta il campione di tessuto auricolare (vedere "Preparazione del campione"). Se il risultato è nuovamente sospetto, è necessario prelevare un campione di sangue e analizzarlo con il test ELISA di IDEXX BVDV Ag/Serum ELISA Plus, mediante isolamento del virus o tramite PCR per il BVDV. Se esistono dubbi riguardo lo stato di un animale di valore risultato positivo, ripetere l'esame su un altro campione prelevato 7-14 giorni dopo il campione iniziale per confermare l'infezione persistente. Si consiglia di confermare i risultati positivi ottenuti con l'analisi di sangue intero utilizzando siero o plasma dello stesso animale. In caso di analisi di campioni di tessuto del padiglione auricolare (ear notch), non è presente alcun gap diagnostico.

Assistenza tecnica:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contattare il responsabile di zona o il distributore IDEXX o consultare il sito: idexx.com/contactlpd

IDEXX e Test With Confidence sono un marchio di proprietà di, e/o registrato da, IDEXX Laboratories, Inc. o dei suoi affiliati e protetti negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

© 2016 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti sono riservati.

WARNING/ATTENTION/ATENCIÓN/ATENÇÃO/ACHTUNG/ATTENZIONE



EUH208

Positive control / Wash concentrate – Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Contrôle positif / Solution de lavage concentrée – Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Control Positivo / Concentrado de Lavagem – Contém Kathon. Pode provocar uma reação alérgica.

Control Positivo / Solución de Lavado Concentrada – Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

Positive Kontrolle / Waschkonzentrat – Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Controllo positivo / Soluzione di lavaggio concentrata – Contiene Kathon. Può provocare una reazione allergica.

H316 / P332+P313 / EUH208

Conjugate – Causes mild skin irritation. If skin irritation occurs: Get medical advice / attention. Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Conjugué – Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Conjugado – Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Contém Kathon. Pode provocar uma reação alérgica.

Conjugado – Provoca una leve irritación cutánea. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

Konjugat – Verursacht milde Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Coniugato – Provoca delicato irritazione della pelle. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Contiene Kathon. Può provocare una reazione allergica.

H319 / P280 / P337+P313 / EUH208

Ear Notch Tissue Soaking Buffer – Causes serious eye irritation. Wear eye protection. If eye irritation persists: Get medical advice / attention. Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Tampon d'éluion pour biopsie d'oreille – Provoque une sévère irritation des yeux. Porter un équipement de protection des yeux. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Solución tampón para muesca de oreja – Provoca irritación ocular grave. Llevar gafas de protección. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

Tampão para o fragmento da orelha – Provoca irritação ocular grave. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Usar luvas de proteção / vestuário de proteção / proteção ocular / proteção facial.

Puffer für Ohrgewebe-Stanzproben – Verursacht schwere Augenreizung. Augenschutz tragen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Soluzione tampone – Provoca grave irritazione oculare. Proteggere gli occhi. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. Contiene Kathon. Può provocare una reazione allergica.

H315 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313

TMB Substrate – Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves / eye protection / face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice / attention. If eye irritation persists: Get medical advice / attention.

Substrat TMB – Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection / un équipement de protection des yeux / du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Substrato TMB – Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção / proteção ocular / proteção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Substrato TMB – Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes / gafas / máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

TMB-Substrat – Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Substrato TMB – Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Indossare guanti / Proteggere gli occhi / il viso. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

H316 / H319 / P280 / P332+P313 / P337+P313 / EUH208

Detection Antibodies – Causes mild skin irritation. Causes serious eye irritation. Wear protective gloves / eye protection / face protection. If skin irritation occurs: Get medical advice / attention. If eye irritation persists: Get medical advice / attention. Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Solution de détection – Provoque une légère irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection / un équipement de protection des yeux / du visage. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Solução Detectora – Causa uma irritação suave da pele. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção / proteção ocular / proteção facial. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Contém Kathon. Pode provocar uma reação alérgica.

Solución de Detección – Provoca una leve irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes / gafas / máscara de protección. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

Detektorlösung – Verursacht milde Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Anticorpi per il rilevamento – Provoca delicato irritazione della pelle. Provoca grave irritazione oculare. Indossare guanti / Proteggere gli occhi / il viso. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. Contiene Kathon. Può provocare una reazione allergica.

Stop solution – Harmful if swallowed. Causes skin irritation. May cause an allergic skin reaction. Causes serious eye irritation. May cause respiratory irritation. Wear protective gloves/eye protection/face protection. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Take off and wash contaminated clothing before reuse. Dispose of contents in accordance with local/regional/national/international regulations.

Solution d'arrêt – Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer une allergie cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Porter des gants de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Solução de Interrupção – Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Usar luvas de proteção/ proteção ocular/proteção facial. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de voltar a usar. Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com os regulamentos locais/regionais/nacionais/internacionais.

Solución de Frenado – Nocivo en caso de ingestión. Provoca irritación cutánea. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias. Llevar guantes/gafas/máscara de protección. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Stopplösung – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht Hautreizungen. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann die Atemwege reizen. Schutzhandschuhe/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/ internationalen Vorschriften zuführen.

Soluzione di arresto – Nocivo se ingerito. Provoca irritazione della pelle. Può provocare una reazione allergica cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può irritare le vie respiratorie. Indossare guanti/Proteggere gli occhi/ il viso. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrição dos símbolos Descripciónes de los símbolos / Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli

| | |
|---|---|
|  | Batch Code (Lot) / Numéro de lot / Código de lote (Lote) Número de Partida (Lote) / Chargenbezeichnung (Ch.-B.) / Codice del lotto (partita) |
|  | Serial Number / Numéro de série / Número de série Número de serie / Seriennummer / Numero di serie |
|  | Catalog Number / Numéro de catalogue / Número de catálogo Número de catálogo / Katalognummer / Numero di catalogo |
|  | In vitro diagnostic / Diagnostic in vitro / Diagnóstico in-vitro Diagnóstico in-vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostico in vitro |
|  | Authorized Representative in the European Community Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea |
|  | Positive Control / Contrôle positif / Controle Positivo Control Positivo / Positive Kontrolle / Controllo Positivo |
|  | Negative Control / Contrôle négatif / Controle Negativo Control Negativo / Negative Kontrolle / Controllo Negativo |
|  | Use by date / À utiliser avant la date / Data de Vencimento Usar antes de / Verwendbar bis / Usare entro |
|  | Date of manufacture / Date de fabrication / Data de Fabricação Fecha de fabricación / Herstellungsdatum / Data di produzione |
|  | Manufacturer / Fabricant / Fabricante Fabricante/ Hersteller / Ditta produttrice |
|  | Temperature limitation / Limite de température Limite de temperatura / Limite de temperatura Zulässiger Temperaturbereich / Limite di temperatura |
|  | Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation Consulte instruções para o uso / Consultar las instrucciones de uso Gebrauchsinformation beachten / Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | Major change in the user instructions Modification majeure du mode d'emploi Modificações importante nas instruções de uso Modificación importante en el manual de instrucciones Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation Modifica importante nell'inserto tecnico |

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Manufacturer

IDEXX Switzerland AG
Stationsstrasse 12
CH-3097 Liebefeld-Bern
Switzerland

EU-Representative

IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com

IDEXX