



***Ornithobacterium rhinotracheale* Antibody Test Kit**

**Kit de détection des anticorps dirigés contre
*Ornithobacterium rhinotracheale***

**Kit para detecção de anticorpos contra
*Ornithobacterium rhinotracheale***

**Kit para la detección de Anticuerpos frente a
*Ornithobacterium rhinotracheale***

**Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen
*Ornithobacterium rhinotracheale***

Ornithobacterium rhinotracheale Antibody Test Kit

For veterinary use only.

Name and Intended Use

IDEXX ORT is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection antibody to *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in chicken and turkey serum.

General Information

Ornithobacterium rhinotracheale has been associated with respiratory disease, increased mortality, retarded growth and decreased egg production in avian species worldwide. Viral or bacterial infections by e.g., IBV, TRT, and NDV are able to trigger an ORT infection.¹ An assessment of immune status as well as serologic identification of ORT requires a measurement of antibody to ORT in serum. Enzyme immunoassay systems have proven efficacious in the quantification of antibody levels to ORT and facilitate the monitoring of immune status in large flocks. IDEXX ORT detects serological response to ORT serotypes A-M.

Descriptions and Principles

Bacterial antigen is coated on 96- well plates. Upon incubation of the test sample in the coated well, antibody specific to ORT forms a complex with the coated bacterial antigens. After washing away unbound material from the wells, a conjugate is added which binds to any attached chicken and turkey antibody in the wells. Unbound conjugate is washed away and enzyme substrate is added. Subsequent color development is directly related to the amount of antibody to ORT present in the test sample.

Reagents

Volume

| | | |
|---|--------------------------|------------|
| 1 | ORT Antigen Coated Plate | 5 |
| 2 | Positive Control | 1 x 1.9 mL |
| 3 | Negative Control | 1 x 1.9 mL |
| 4 | Conjugate | 1 x 50 mL |
| 5 | Sample Diluent | 1 x 235 mL |
| A | TMB Substrate | 1 x 60 mL |
| B | Stop Solution | 1 x 60 mL |

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
- 96-well microplate reader (equipped with 650 nm filter)
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test
- Vortex or equivalent
- Tubes for diluting 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 Samples

Dilute test samples five hundred fold (1:500) with the Sample Diluent prior to being assayed (e.g., by diluting 1 μ L of sample with 500 μ L of Sample Diluent). **NOTE: DO NOT DILUTE CONTROLS.**

Test Procedure

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

- 1 Obtain antigen coated plates and record the sample position.
- 2 Dispense 100 μL of UNDILUTED Negative Control (NC) into duplicate wells.
- 3 Dispense 100 μL of UNDILUTED Positive Control (PC) into duplicate wells.
- 4 Dispense 100 μL of DILUTED sample into appropriate wells.
- 5 Incubate for 30 (± 2 min.) minutes at 18–26°C.
- 6 Remove the solution and wash each well with approximately 350 μL of distilled or deionized water 3–5 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.
- 7 Dispense 100 μL of Conjugate into each well.
- 8 Incubate for 30 (± 2 min.) minutes at 18–26°C.
- 9 Repeat step 6.
- 10 Dispense 100 μL of TMB Substrate into each well.
- 11 Incubate for 15 (± 1 min.) minutes at 18–26°C.
- 12 Dispense 100 μL of Stop Solution into each well.
- 13 Measure and record absorbance values at 650 nm, A(650).

14 Calculations:

Controls

$$NC\bar{x} = \frac{NC1 A(650) + NC2 A(650)}{2}$$

$$PC\bar{x} = \frac{PC1 A(650) + PC2 A(650)}{2}$$

Validity criteria

$$PC\bar{x} - NC\bar{x} > 0.075$$

$$NC\bar{x} \leq 0.150$$

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert.

Samples

$$S/P = \frac{\text{Sample Mean A}(650) - \text{NC}\bar{x}}{\text{PC}\bar{x} - \text{NC}\bar{x}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ Titer} = 1.09 (\text{Log}_{10} S/P) + 3.36^*$$

*Relates S/P at a 1:500 dilution to an endpoint titer

The Positive Control is standardized and represents significant antibody levels to ORT in chicken and turkey serum. The relative level of antibody in the sample is determined by calculating the sample to positive (S/P) ratio. Endpoint titers are calculated using these equations.

15 Interpretation:

| Negative | Positive |
|------------|------------|
| S/P ≤ 0.40 | S/P > 0.40 |

A positive result (titer greater than 844) indicates vaccination or other exposure to ORT. Each laboratory should establish its own criterion for immunity with respect to antibody titer based on correlation of IDEXX ORT to current laboratory test methodologies and on historical antibody responses to specific vaccines and vaccination protocols. The immune status of a flock is best assessed by monitoring and recording antibody titers in representative samples as a function of time. The resulting flock profiles allow an assessment of the distribution of antibody titers and an analysis of changes in titer over time.

Note: IDEXX has instrument and software systems available which calculate results and provide data summaries.

References

1. P.C.M van Empel & H.M. Hafez 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a Review. Avian Pathology, vol 28 pp 217-227.

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

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit de détection des anticorps dirigés contre *Ornithobacterium rhinotracheale*

Réservé à l'usage vétérinaire.

Définition et application

IDEXX ORT est un test immunoenzymatique (ELISA) monocupule pour la détection d'anticorps dirigés contre *Ornithobacterium rhinotracheale* à partir du sérum de poulet et de dinde.

Informations Générales

L'infection à *Ornithobacterium rhinotracheale* est associée à des maladies respiratoires, à un taux de mortalité augmenté, des retards de croissance et une baisse de ponte chez les espèces aviaires au niveau mondial. Des infections virales ou bactériennes telles que IBV, TRT ou NDV sont des facteurs favorisants de l'infection à ORT.¹ Le dosage des anticorps présents dans le sérum de l'animal permet d'évaluer le statut immunitaire de ce dernier au regard de *Ornithobacterium rhinotracheale*. Le dosage immunoenzymatique s'est avéré être une méthode efficace pour évaluer le niveau des anticorps produits par l'organisme contre la maladie et contrôler l'état immunitaire des grands troupeaux. Le kit ELISA IDEXX ORT permet la détection sérologique respective des sérotypes ORT A et M.

Description et principe

Le dosage a pour but de mesurer le niveau relatif d'anticorps présents à partir du sérum de poulet ou de dinde à tester vis à vis de *Ornithobacterium rhinotracheale*. Chaque plaque est constituée de 96 cupules sensibilisées avec l'antigène bactérien. Les anticorps spécifiques de *Ornithobacterium rhinotracheale* s'ils sont présents dans l'échantillon à tester se fixent sur l'antigène sensibilisé sur la microplaque et forment un complexe Ag-Ac. Les fractions non liées sont ensuite éliminées par lavage et un conjugué marqué à la peroxydase se lie aux anticorps anti-poulet et anti-dinde précédemment fixés. Les fractions non fixées sont éliminées par lavage et la réaction est révélée par oxydation du substrat de l'enzyme correspondante, qui se traduit par une réaction colorée. La coloration obtenue est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon à tester.

Réactifs

| | | Volume |
|---|---|------------|
| 1 | Plaque sensibilisée avec l'antigène ORT | 5 |
| 2 | Contrôle positif | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Contrôle négatif | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Conjugué | 1 x 50 ml |
| 5 | Diluant des échantillons | 1 x 235 ml |
| A | Substrat TMB | 1 x 60 ml |
| B | Solution d'arrêt | 1 x 60 ml |

Note: 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
- Éprouvette graduée pour la préparation de la solution de lavage
- Lecteur de plaque 96 puits (équipé d'un filtre à 650 nm)
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation des réactifs
- Vortex ou équivalent
- Microtubes pour la dilution des échantillons

Précautions d'emploi et mises en garde

- Manipuler tout matériel biologique comme étant potentiellement infectieux.
- 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 échantillons

Diluer les échantillons à tester au 1:500 dans le diluant d'échantillons (1 μ l de sérum + 500 μ l de diluant d'échantillons). **REMARQUE: NE PAS DILUER LES CONTROLES.**

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 des échantillons sur la microplaque.

- 2 Distribuer 100 µl de Contrôle négatif (CN) NON DILUE dans deux puits.

- 3 Distribuer 100 µl de Contrôle positif (CP) NON DILUE dans deux puits.

- 4 Distribuer 100 µl d'échantillon DILUE dans les puits appropriées.

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

- 6 Éliminer le liquide contenu dans les puits de la microplaque et laver 3–5 fois chaque puits avec environ 350 µl d'eau distillée ou désionisée. Éviter 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.

- 7 Distribuer 100 µl de Conjugué par puits.

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

- 9 Répéter l'étape 6.

- 10 Distribuer 100 µl de Substrat TMB par puits.

- 11 Incuber pendant 15 minutes (±1 min.) à 18–26°C.

- 12 Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt par puits.

- 13 Lire la densité optique des échantillons et des contrôles à l'aide d'un spectrophotomètre en monochromatisme à 650 nm.

14 Calculs:

Contrôles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2}$$

Critères de validité

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} > 0,075$$

$$CN\bar{x} \leq 0,150$$

Si le test est invalide, la technique doit être suspectée et le test répété en suivant scrupuleusement le mode opératoire.

Échantillons

$$E/P = \frac{\text{Echantillon A}(650) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{Titer} = 1,09 (\text{Log}_{10} E/P) + 3,36^*$$

*Établit le rapport entre E/P (dilution 1:500) et un titre final.

Le Contrôle positif est standardisé et représente un taux important d'anticorps anti-ORT dans du sérum de poulet ou de dinde. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée par la valeur du rapport E/P pour chaque échantillon. Les titres sont calculés selon la formule décrite ci-dessus.

15 Interprétation:

Négatifs

Positifs

E/P ≤ 0,40

E/P > 0,40

Un résultat positif (titre supérieur à 844) indique une vaccination ou une exposition au virus ORT. Chaque laboratoire doit arrêter ses propres critères d'immunisation concernant le titre des anticorps en fonction de la corrélation établie entre IDEXX ORT et les méthodes d'analyses utilisées en laboratoire ainsi que des réponses habituelles des anticorps aux vaccins et aux protocoles de vaccination. L'état immunitaire d'un troupeau est plus facile à déterminer en surveillant et en consignait les titres des anticorps en tant qu'échantillons représentatifs de manière chronologique. Les profils de troupeau qui sont obtenus permettent de déterminer la répartition des titres des anticorps et de suivre l'évolution des titres au fil du temps.

Remarque: IDEXX fournit équipements et logiciels pour le calcul des résultats et la synthèse des données.

Références

1. P.C.M van Empel & H.M. Hafez 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a Review. Avian Pathology, vol 28 pp 217-227.

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 votre distributeur ou visitez notre site web:
idexx.com/contactipd

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.

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

Kit para detecção de anticorpos contra *Ornithobacterium rhinotracheale*

Para uso exclusivamente veterinário.

Nome e Indicações

IDEXX ORT é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de anticorpos contra *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) em amostras de soro de galinhas e perus.

Informações Gerais

O *Ornithobacterium rhinotracheale* tem sido associado a doença respiratória, mortalidade aumentada, crescimento retardado e queda na produção de ovos em espécies aviárias em todo o mundo. Infecções virais ou bacterianas como por exemplo, IBV, TRT, NDV são capazes de desencadear uma infecção por ORT.¹ Uma avaliação do estado de imunidade assim como a identificação sorológica do ORT requerem a quantificação de anticorpos contra ORT no soro. Os sistemas de ensaio imunoenzimático provaram ser eficazes na quantificação de níveis de anticorpos de ORT e facilitam o monitoramento do estado de imunidade em grandes lotes. O ELISA IDEXX ORT detecta a resposta sorológica a sorotipos de A–M do ORT.

Descrição e Princípios

O antígeno bacteriano é impregnado em placas de 96 cavidades. Após a incubação da amostra de teste na placa impregnada, os anticorpos específicos contra ORT formam um complexo com o antígeno bacteriano. Após lavar o material não aderido às cavidades, o conjugado é adicionado e se liga a quaisquer anticorpos de galinhas ou perus dos complexos formados. O conjugado não aderido é lavado e um substrato enzimático é adicionado. O desenvolvimento subsequente de cor é diretamente relacionado com a presença de anticorpos anti-ORT na amostra teste.

Reagentes

| | | Volume |
|---|-----------------------------------|------------|
| 1 | Placa Impregnada com antígeno ORT | 5 |
| 2 | Controle Positivo | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Controle Negativo | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Conjugado | 1 x 50 ml |
| 5 | Diluyente de Amostra | 1 x 235 ml |
| A | Substrato TMB | 1 x 60 ml |
| B | Solução de Interrupção | 1 x 60 ml |

Nota: Ver a tabela no final do inserte para a descrição dos símbolos utilizados no 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 e micropipetas multicanal
- Ponteiras de pipeta descartáveis
- Leitor de placas para 96 cavidades (equipado com filtro 650 nm)
- Lavador de microplaca (sistema manual, semi-automático ou automático)
- Usar somente água destilada ou deionizada para o preparo dos reagentes usados no teste
- Vórtex ou equivalente
- Tubos para diluição das amostras

Precauções e Advertências

- Manipular todos os materiais biológicos como potencialmente infectantes.
- Usar luvas de proteção / vestuário / proteção para os olhos ou face ao manusear amostras e reagentes.
- Consultar a ficha de segurança do produto para informações adicionais.
- Ver no final do protocolo as medidas de prevenção relacionadas aos perigos potenciais de alguns reagentes.

Práticas laboratoriais

- Resultados ótimos serão obtidos seguindo-se 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.

Preparo dos Amostra

Diluir amostras de teste em proporção 1:500 com Diluente de Amostra antes de serem testadas (por exemplo, diluindo-se 1 μ l de amostra com 500 μ l de Diluente de Amostra).

NOTA: NÃO DILUIR CONTROLES.

Procedimento de Teste

Permitir que os reagentes atinjam 18–26°C, então mesclar gentilmente através de inversão ou movimentos circulares leves.

- 1 Obter placa(s) impregnada(s) de antígeno e registrar a posição da amostra.

- 2 Dispensar 100 µl de Controle Negativo (CN) NÃO DILUÍDO em duplicata.

- 3 Dispensar 100 µl de Controle Positivo (CP) NÃO DILUÍDO em duplicata.

- 4 Dispensar 100 µl de amostra DILUÍDA nas cavidades apropriadas.

- 5 Incubar por 30 minutos (±2 min.) à 18–26°C.

- 6 Remover o conteúdo líquido das cavidades da placa e lave cada cavidade com aproximadamente 350 µl de água destilada ou deionizada por 3–5 vezes. Evitar que a placa seque entre as lavagens e antes da adição do próximo reagente. Após a lavagem final, Remover o fluido residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.

- 7 Dispensar 100 µl de Conjugado em cada cavidade.

- 8 Incubar por 30 minutos (±2 min.) à 18–26°C.

- 9 Repetir passo 6.

- 10 Dispensar 100 µl de Substrato TMB em cada cavidade.

- 11 Incubar por 15 minutos (±1 min.) à 18–26°C.

- 12 Dispensar 100 µl de Solução de Interrupção em cada cavidade.

- 13 Medir e registrar valores de absorbância a 650 nm, A(650).

14 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2}$$

Critérios de Validade

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} > 0,075$$

$$CN\bar{x} \leq 0,150$$

Para testes inválidos, deve-se suspeitar da técnica, e o teste deve ser repetido após a revisão cuidadosa do protocolo do produto.

Amostras

$$A/P = \frac{\text{Média da Amostra A}(650) - \text{CN}\bar{x}}{\text{CP}\bar{x} - \text{CN}\bar{x}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{Título} = 1,09 (\text{Log}_{10} A/P) + 3,36^*$$

*Relaciona A/P em uma diluição 1:500 com um título final.

O Controle Positivo é padronizado e representa níveis significativos de anticorpos contra ORT em amostras de soro de galinha e peru. O nível relativo de anticorpos da amostra é determinado calculando-se a razão amostra/Positivo (A/P). Os títulos de anticorpos finais são calculados usando a equação descrita acima.

15 Interpretação:

Negativas

$$A/P \leq 0,40$$

Positivas

$$A/P > 0,40$$

Os resultados positivos (títulos maiores que 844) indicam vacinação ou exposição ao ORT. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para imunidade com respeito à titulação de anticorpos baseado em correlação de IDEXX ORT com metodologias atuais de teste de laboratório e em históricos de respostas de anticorpos a vacinas e protocolos de vacinação específicos. A condição imunológica de um lote é melhor avaliada pelo monitoramento e registro de titulações de anticorpos em amostras representativas em função do tempo. Os perfis de lote resultantes permitem uma avaliação da distribuição de titulações de anticorpos e uma análise de mudanças em titulações ao longo do tempo.

Nota: IDEXX tem instrumentos e software disponíveis para o cálculo de resultados e a elaboração de resumo de dados.

Referências

1. P.C.M van Empel & H.M. Hafez 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a Review. Avian Pathology, vol 28 pp 217-227.

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

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.

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Ornithobacterium rhinotracheale*

Para uso veterinario exclusivo.

Nombre y uso propuesto

IDEXX ORT es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para detectar anticuerpos específicos frente a *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) en suero de pollo y pavo.

Información general

Se asocia el *Ornithobacterium rhinotracheale* con enfermedades respiratorias, incremento de la mortalidad, retraso en el crecimiento y disminución de la producción de huevos. Otras infecciones virales o bacterianas como por ejemplo, IBV, TRT, NDV, pueden provocar una infección por ORT.¹ La evaluación de la condición inmunitaria y la identificación serológica requiere una medición del anticuerpo contra ORT en el suero. Los inmunoanálisis enzimáticos han demostrado ser un método eficaz en la medición cuantitativa de las concentraciones del anticuerpo contra ORT, y facilitan el control de la condición inmunitaria en grupos grandes. El ELISA IDEXX ORT detecta la respuesta serológica frente a serotipos de ORT A–M.

Descripción y principios

Se tapizan los 96 pocillos de las placas con el antígeno bacteriano. Después de la incubación de la muestra en el pocillo tapizado, se agrega un anticuerpo específico frente a ORT, que forma un complejo con los antígenos bacterianos. Después de eliminar por lavado el material no unido, se añade a los pocillos un conjugado que se une a los complejos del anticuerpo de pollo o pavo en los pocillos. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y se agrega a los pocillos un sustrato enzimático. El cambio de color resultante está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpo anti-ORT presente en la muestra.

Reactivos

Volumen

| | Reactivos | Volumen |
|---|---------------------------------|------------|
| 1 | Placa tapizada con Antígeno ORT | 5 |
| 2 | Control Positivo | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Control Negativo | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Conjugado | 1 x 50 ml |
| 5 | Diluyente de la Muestra | 1 x 235 ml |
| A | Sustrato TMB | 1 x 60 ml |
| B | Solución de Frenado | 1 x 60 ml |

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
- Lector de placas de 96 pocillos (equipado con filtros de 650 nm)
- Lavador de placas, manual, semiautomático o automático
- Usar sólo agua destilada o desionizada para preparar los reactivos de la prueba
- Vortex o equivalente
- Tubos para dilución de las muestras

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 las muestras

Diluya las muestras 1:500 con el Diluyente de la Muestra antes de efectuar el análisis (por ejemplo, diluir 1 μ l de la muestra con 500 μ l de Diluyente). **NOTA: NO DILUIR LOS CONTROLES.**

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 Obtener la Placa (o placas) tapizada(s) con antígeno y anotar la posición de las muestras.

- 2 Dispensar 100 µl de Control Negativo (CN) NO DILUIDO en pocillos duplicados.

- 3 Dispensar 100 µl de Control Positivo (CP) NO DILUIDO en pocillos duplicados.

- 4 Dispensar 100 µl de muestra DILUIDA en los pocillos apropiados.

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

- 6 Eliminar el contenido líquido de cada pocillo y lave cada pocillo con aproximadamente 350 µl de agua destilada o desionizada 3–5 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.

- 7 Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pocillo.

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

- 9 Repetir el paso 6.

- 10 Dispensar 100 µl de Substrato TMB en cada pocillo.

- 11 Incubar durante 15 minutos (±1 min.) a 18–26°C.

- 12 Dispensar 100 µl de la Solución de Frenado en cada pocillo.

- 13 Medir y anotar los valores de absorbancia a 650 nm, A(650).

14 Cálculos:

Controles

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2}$$

Criterios de Validación

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} > 0,075$$

$$CN\bar{x} \leq 0,150$$

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.

Muestras

$$M/P = \frac{\text{Media de la Muestra A}(650) - \text{CN}\bar{x}}{\text{CP}\bar{x} - \text{CN}\bar{x}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1,09 (\text{Log}_{10} M/P) + 3,36^*$$

*Relaciona el cociente M/P en una dilución de 1:500 con un título final.

El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas del anticuerpo anti-ORT en el suero de pollo. La concentración relativa del anticuerpo en la muestra se determina a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo, M/P. Los títulos finales de anticuerpos se calculan mediante la ecuación descrita arriba.

15 Interpretación:

| Negativo | Positivo |
|------------|------------|
| M/P ≤ 0,40 | M/P > 0,40 |

Un resultado positivo (títulos mayores que 844) indica vacunación u otra exposición a ORT. Cada laboratorio debe establecer su propio criterio para inmunidad con respecto al título del anticuerpo, de acuerdo con la correlación del kit IDEXX ORT con los métodos de laboratorio actuales para pruebas, y las respuestas del anticuerpo observadas en el pasado hacia vacunas específicas y protocolos de inmunización. La mejor manera de evaluar el estado inmunitario de un grupo de aves es mediante el control y el seguimiento de los títulos del anticuerpo en muestras representativas en función del tiempo. Los datos resultantes para el grupo permiten evaluar la distribución de los títulos del anticuerpo y analizar los cambios de título con el tiempo.

Nota: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de resultados y la elaboración de resúmenes de datos.

Bibliografía

1. P.C.M van Empel & H.M. Hafez 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a Review. Avian Pathology, vol 28 pp 217-227.

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/contactlpld

N.º de registro: 2868-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.

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Ornithobacterium rhinotracheale*

Nur zum tierärztlichen Gebrauch.

Name und Verwendungszweck

IDEXX ORT ist ein Enzymimmunoassay von IDEXX zum Nachweis von Antikörpern gegen *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in Serumproben von Hühnern und Puten.

Allgemeine Informationen

Ornithobacterium rhinotracheale konnte in der Vergangenheit weltweit bei Hühnern und Puten mit Atemwegssymptomen, erhöhter Mortalität, verminderter Wachstumsrate und verminderter Legeleistung isoliert werden. Andere virale und bakterielle Infektionen wie IBV, TRT und NDV können durch eine ORT Infektion ausgelöst werden.¹ Untersuchungen des Immunstatus eines Bestandes sowie der serologische Nachweis einer ORT-Infektion erfordern die quantitative Bestimmung von ORT-Antikörpern in Serumproben des Bestandes. Enzymimmunoassays haben sich als effektiv zum Nachweis von Antikörpern gegen ORT erwiesen und vereinfachen die Kontrolle des Immunstatus großer Bestände. Der IDEXX ORT ELISA weist Antikörper gegen alle Serotypen (A-M) nach.

Beschreibung des Testprinzips

Es wurden Mikrotiterplatten mit bakteriellem Antigen beschichtet. Bei der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung bilden spezifische Antikörper gegen die ORT einen Komplex mit dem bakteriellen Antigen. Nachdem ungebundenes Material herausgewaschen ist, wird ein Konjugat hinzugefügt, welches sich an die Hühner- und Putenantikörper bindet. Im letzten Testschritt wird ungebundenes Konjugat herausgewaschen und ein Enzymsubstrat und ein Chromogen in die Vertiefungen gegeben. Die darauffolgende Farbentwicklung steht in direkter Korrelation zur Menge von ORT-Antikörpern in der Probe.

Reagenzien

Menge

| | | Menge |
|---|---|------------|
| 1 | Mit ORT-Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert) | 5 |
| 2 | Positive Kontrolle | 1 x 1,9 ml |
| 3 | Negative Kontrolle | 1 x 1,9 ml |
| 4 | Konjugat | 1 x 50 ml |
| 5 | Probenverdünnungspuffer | 1 x 235 ml |
| A | TMB-Substrat | 1 x 60 ml |
| B | Stopplösung | 1 x 60 ml |

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 Multikanalpipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Photometer (für 96 Vertiefungen, ausgestattet mit 650 nm Messfilter)
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Zur Vorbereitung der Reagenzien nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser verwenden
- Vortex-Mischer oder gleichwertiger Mischer
- Röhrchen für die Verdünnung der Proben

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 sowie 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 Proben

Die Proben 1:500 mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnen, bevor sie getestet werden (z.B.: 1 µl der Probe mit 500 µl des Probenverdünnungspuffers). **ACHTUNG: KONTROLLEN NICHT VERDÜNNEN!**

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.

- 2 100 µl UNVERDÜNNT negative Kontrolle (NK) in zwei Vertiefungen geben.

- 3 100 µl UNVERDÜNNT positive Kontrolle (PK) in zwei Vertiefungen geben.

- 4 100 µl VERDÜNNT Probe in die restlichen Vertiefungen geben.

- 5 30 Minuten (± 2 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

- 6 Den flüssigen Inhalt aus den Vertiefungen absaugen und sodann mit etwa 350 µl destilliertem oder demineralisiertem Wasser 3- bis 5-mal waschen. Dabei ein Austrocknen der Platte zwischen den Waschschritten und der Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden. Nach dem letzten Waschen die Platte auf saugfähigem Material ausklopfen, um verbleibende Restflüssigkeit zu entfernen.

- 7 100 µl Konjugat in jede Vertiefung geben.

- 8 30 Minuten (± 2 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

- 9 Schritt 6 wiederholen.

- 10 100 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung geben.

- 11 15 Minuten (± 1 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

- 12 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung geben.

- 13 Messen und Notieren der Extinktionswerte bei 650 nm, A(650).

14 Berechnungen:

Kontrollen

$$NK\bar{x} = \frac{NK1 A(650) + NK2 A(650)}{2}$$

$$PK\bar{x} = \frac{PK1 A(650) + PK2 A(650)}{2}$$

Validitätskriterien

$$PK\bar{x} - NK\bar{x} > 0,075$$

$$NK\bar{x} \leq 0,150$$

Ungültige Ergebnisse sind möglicherweise auf eine nicht sachgemäße Durchführung zurückzuführen. Der Test sollte nach erneutem, sorgfältigem Durchlesen der Gebrauchsinformation wiederholt werden.

Proben

$$P/PK = \frac{\text{Mittelwert der Probe A(650)} - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{Titer} = 1,09 (\text{Log}_{10} P/PK) + 3,36^*$$

*Nachstehende Gleichung verbindet den P/PK-Wert bei einer Verdünnung von 1:500 mit einem Endpunkt-Titer

Die positive Kontrolle ist genormt und enthält eine signifikante Menge von ORT-Antikörpern. Die relative Menge der Antikörper in der zu testenden Serumprobe kann festgestellt werden, indem man das Verhältnis der Probe zur positiven Kontrolle (P/PK) berechnet. Endpunkt-Titer werden nach der oben angegebenen Formel berechnet.

15 Interpretation:

Negativ

$$P/PK \leq 0,40$$

Positiv

$$P/PK > 0,40$$

Ein positives Ergebnis (Titer größer als 844) deutet auf eine Impfung oder einen anderen Kontakt mit ORT hin. Jedes Labor sollte seine eigenen Erfahrungswerte für die Interpretation der IDEXX ORT-Ergebnisse sammeln. Dazu sollten die Ergebnisse früher angewandter serologischer Testsysteme mit den IDEXX-Ergebnissen unter Berücksichtigung der angewandten Impfstoffe und Impfprogramme verglichen werden. Der Immunstatus einer Herde wird am sinnvollsten geprüft, indem man die Antikörpertiter an repräsentativen Beispielen regelmäßig überwacht und aufzeichnet. Der daraus resultierende Herdenquerschnitt ermöglicht die Bewertung der Antikörperverteilung und eine Analyse von Titerveränderungen im Laufe der Zeit.

Hinweis: IDEXX bietet auch Geräte und Softwaresysteme zur Berechnung der Ergebnisse und zur Datenverarbeitung an.

Literatur

1. P.C.M van Empel & H.M. Hafez 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a Review. Avian Pathology, vol 28 pp 217-227.

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

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.

© 2015 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

WARNING / ATTENTION / ATENCIÓN / ATENÇÃO / ACHTUNG



EUH208

Positive control / Negative Control – Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Contrôle positif / Contrôle négatif – Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Controle Positivo / Controle Negativo – Contém Kathon. Pode provocar uma reacção alérgica.

Control Positivo / Control Negativo – Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

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

H316 / P332+P313 / EUH208

Conjugate – Causes mild skin irritation. Wear protective gloves. Contains Kathon. May produce an allergic reaction.

Conjugué – Provoque une légère irritation cutanée. Porter des gants de protection. Contient Kathon. Peut produire une réaction allergique.

Conjugado – Causa uma irritação suave da pele. Usar luvas de protecção. Contém Kathon. Pode provocar uma reacção alérgica.

Conjugado – Provoca una leve irritación cutánea. Llevar guantes de protección. Contiene Kathon. Puede provocar una reacción alérgica.

Konjugat – Verursacht milde Hautreizungen. Schutzhandschuhe tragen. Enthält Kathon. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

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 – 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 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.

**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrições do símbolos
 Descripciones 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 Européia 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 / Límite 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