

BVDV/MD/BDV p80 Protein Antibody Test Kit

**Kit de détection des Anticorps dirigés contre la protéine p80
du BVDV/MD/BDV**

**Kit para Detecção de Anticorpos Anti-p80 contra o
BVDV/MD/BDV**

USO VETERINÁRIO

**Kit para la detección de Anticuerpos frente a la proteína p80
del BVDV/MD/BDV**

**Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das p80-Protein
des BVDV/MD/BDV**

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

BVDV/MD/BDV p80 Protein Antibody Test Kit

For veterinary use only

Name and Intended Use

IDEXX BVDV p80 Ab is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection of Antibodies directed against p80 protein for diagnostic of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Mucosal Disease (MD) in individual serum, plasma and milk samples and in pools of serum (maximum 10) and tank milk samples from bovine origin and for diagnostic of Border Disease (BD) in individual serum and plasma samples and pools of serum samples (maximum 5) from sheep.

General Information

The Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) is a pestivirus, which causes two diseases: Bovine Viral Diarrhoea (BVD) and Mucosal Disease (MD). Bovine Viral Diarrhoea is a pathology induced by one of the two strains of the virus (cytopathogenic and non-cytopathogenic). The acute form, characterised by fever and diarrhoea, is transient, with high morbidity rates and low mortality rates. Adult animals can also be infected with an asymptomatic subclinical form. Mucosal Disease has low morbidity rates (1%), but high mortality rates. Most often it is characterized by ulcers at different levels of the digestive tract and diarrhoea that is often hemorrhagic. Many pathologies are associated with or aggravated by the BVDV, including, among others, respiratory diseases, slow development, congenital defects, etc... Mucosal Disease occurs in calves infected during gestation (Immunotolerant Persistently Infected (I.P.I.) animals). These animals were infected with a non-cytopathogenic strain by the transplacental way between the 42nd and the 120th day of gestation. This corresponds to a period when immunocompetence is being established in the foetus: foreign antigens present at this time are considered as self-antigens and no immune response is developed against them. Thus, the persistently infected animals do not produce antibodies against the strain they are infected with. Mucosal Disease is induced by mutation of the non cytopathogenic strain to a cytopathogenic strain. The main sources of infection are I.P.I. animals, which continuously produce and shed the virus, and, in a transient manner (during 10 days), animals recently contaminated with a primary BVDV infection. Transmission of the virus can be oral nasal, conjunctival, genital or transplacental. The presence of BVDV in a herd can be detected with serological screening, which reveals the presence of animals with specific antibodies. However, it does not enable persistently infected animals to be detected. Previously based on seroneutralisation methods, this new serological screening test uses the ELISA method. This test can be rapidly implemented. It is reliable and particularly well suited to the analysis of a large number of samples and can be used for tank milk analysis. It is based on the principle of competition between the bovine antibodies and a Peroxidase coupled monoclonal anti-p80-antibody "WB112".

This kit is designed for the detection of Antibodies directed against p80 protein for diagnostic of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Mucosal Disease (MD) in individual serum plasma and milk samples and in pools of serum (maximum 10) and tank milk samples from bovine origin, and for diagnostic of Border Disease (BD) in individual serum and plasma samples and pools of serum samples (maximum 5) from sheep.

Descriptions and Principles

Microplates are coated with p80 proteins attached to the wells via a specific WB103 antibody. Samples to be tested are diluted and incubated in the wells. Upon incubation of the test sample in the coated wells, p80 protein specific Antibodies form immune-complexes with the p80 protein. After washing away unbound material, an anti-p80 protein Antibody enzyme Conjugate is added. In presence of the p80 protein-Antibody immune-complex, the Conjugate is blocked from binding to its corresponding epitops on the microplate. Conversely, in the absence of p80 protein-Antibodies in the test sample, the Conjugate is free to bind to its corresponding epitops on the microplate. Unbound Conjugate is washed away and an enzyme Substrate (TMB) is added. In presence of the enzyme, the Substrate is oxidized and develops a blue compound becoming yellow after blocking. Subsequent color development is inversely proportional to the amount of anti-p80 protein Antibodies in the test sample (see “Calculations” and “Interpretation of results”).

The diagnostic relevance of the result is obtained by comparing the sample Optical Density with the Negative Control mean Optical Density (see “Calculations” and “Interpretation of results”).

Reagents

Store all reagents at 2–8°C.

Reagents	Volume	
1	BVDV/MD/BDV p80 Protein Coated Plates	5
2	Positive Control	2 mL
3	Negative Control	2 mL
4a	(Anti-p80 HRPO) Conjugate Concentrate	0.75 mL
4b	Dilution Buffer N.1	120 mL
5	Dilution Buffer N.9	120 mL
A	TMB Substrate N.9	60 mL
B	Stop Solution N.3	60 mL
C	Wash concentrate (20X)	100 mL

NOTE: see table on page 45 for the description of international symbols used on the kit labels.

Materials Required but Not Provided

- Centrifuge (capacity 2000 x g)
- Vortex or equivalent
- Precision Micropipettes and Multi-dispensing micropipettes (reagents volumes listed in the “Test Protocol” require pipette precision less than or equal to 5%)
- Disposable pipette tips
- Microplate shaker
- Distilled water or deionized water
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- 96-well Microplate reader equipped with 450 nm filter

Precautions and Warnings for Users

- Do not pipette by mouth.
- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
- Controls, TMB-Substrate and Wash concentrate solutions can cause eye irritation.
- Stop Solution can cause severe skin burns and eye damage.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional and national regulations.

Preparation of Reagents

Wash Solution

The Wash Concentrate (20X) must be diluted 1:20 with distilled/deionized water before use (e.g. 15 ml of Wash Concentrate (20X) in 285 ml of distilled water). This solution is hereafter called "Wash Solution".

Note: The Wash Concentrate (20X) should be brought to 18–26°C and well mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. Wash Solution is stable for up to 3 days when stored at 2–8°C.

Conjugate

The Conjugate Concentrate must be diluted 1: 100 in the Dilution Buffer N.1.

Note: Diluted Conjugate solution is stable for up to 8 hours at 18–26°C.

Milk samples

Defatted as well as whole milk samples can be tested.

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use.

Reagents should be mixed by gentle swirling or vortexing. Use a separate pipette tip for each sample. Controls may be dispensed anywhere on the microplate.

Obtain coated microplates and record the position of each sample on a worksheet.

1. Dispense Dilution Buffer N. 9 Controls and samples:

- a) Bovine Individual Serum and Plasma samples: Short incubation [1 hour (\pm 5 min.) at 18–26°C]
 - Dispense 50 μ L of Dilution Buffer N.9 in each well.
 - Dispense 50 μ L of Negative Control into two appropriate wells.
 - Dispense 50 μ L of Positive Control into one appropriate well.
 - Dispense 50 μ L of sample into remaining wells (1 well per sample).
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 1 hour (\pm 5 min.) at 18–26°C.
- b) Bovine Individual Serum and Plasma samples: Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]
 - Dispense 90 μ L of Dilution Buffer N.9 in each well.
 - Dispense 10 μ L of Negative Control into two appropriate wells.
 - Dispense 10 μ L of Positive Control into one appropriate well.
 - Dispense 10 μ L of sample into remaining wells (1 well per sample)
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 16–24 hours at 2–8°C.

- c) Bovine Pool Serum samples (Maximum 10): Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]
- Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in each well.
 - Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells.
 - Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well.
 - Dispense 50 μL of sample into remaining wells (1 well per sample)
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 16–24 hours at 2–8°C.
- Note: Analysis of pools of serum samples from bovine origin is not approved for use in Germany.
- d) Bovine Individual and Tank Milk samples: Short incubation [2 hours (\pm 5 min.) at 18–26°C]
- Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in three appropriate wells.
 - Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells (containing 50 μL of Dilution Buffer N.9).
 - Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well (containing 50 μL of Dilution Buffer N.9).
 - Dispense 100 μL of sample into remaining wells (1 well per sample).
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 2 hours (\pm 5 min) at 18–26°C.
- Note: Tank milk samples analysis is not approved for use in Germany.
- e) Bovine Individual and Tank Milk samples : Overnight incubation [16–24 hours at 18–26°C]
- Dispense 100 μL of Dilution Buffer N.9 in each well.
 - Dispense 100 μL of Negative Control into two appropriate wells.
 - Dispense 100 μL of Positive Control into one appropriate well.
 - Dispense 100 μL of sample into remaining wells (1 well per sample).
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 16–24 hours at 18–26°C.
- Note: Tank milk samples analysis is not approved for use in Germany.
- f) Sheep Individual Serum and Plasma samples and Pool of Serum samples (Maximum 5): Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]
- Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in three appropriate wells.
 - Dispense 75 μL of Dilution Buffer N. 9 in remaining wells.
 - Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells (containing 50 μL of Dilution Buffer N. 9).
 - Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well (containing 50 μL of Dilution Buffer N. 9).
 - Dispense 25 μL of sample per well (containing 75 μL of Dilution Buffer N. 9).
 - Homogenize contents of the wells using a microplate shaker.
 - Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 16–24 hours at 2–8°C.
- Note: Analysis of pools of serum samples from ovine origin is not approved for use in Germany.

2. Wash each well with approximately 300 μL of Wash Solution 3 to 5 times. Aspirate the liquid contents of all well after each wash. Following the final aspiration, firmly tap residual wash fluid from each microplate onto absorbent material. Avoid microplate drying between washes and prior to the addition of the next reagent.
- Note: If skimmed milk (or milk taken from under the cream layer) is used, this type of washing is sufficient. With full fat milk, it is recommended to modify this method of washing by addition of a soak step for 1 minute per wash cycle. This facilitates the elimination of fat particles that are likely to fix in a non-specific way the conjugate in the next step. Thorough washing is essential for optimal results.
3. Dispense 100 μL of diluted Conjugate into each well.
 4. Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 30 minutes (\pm 3 min.) at 18–26°C.
 5. Wash each well with approximately 300 μL of Wash Solution 3 times. Aspirate the liquid contents of all well after each wash. Following the final aspiration, firmly tap residual wash fluid from each microplate onto absorbent material. Avoid microplate drying between washes and prior to the addition of the next reagent.
 6. Dispense 100 μL of TMB Substrate N.9 into each well.
 7. Incubate 20 minutes (\pm 3 min.) at 18–26°C in a dark place.
 8. Dispense 100 μL of Stop Solution N.3 into each well. Shake the microplate by gentle tapping. Wipe carefully the underside of the microplate.
 9. Blank the microplate reader on air.
 10. Measure and record Optical Densities values of samples and Controls at 450 nm.
 11. Calculate results.

Note: When using robotics, incubation of microplates in an incubation chamber allows working without plate covers. Use of robots is also not compatible with gentle microplate tapping or wiping. Plates can be held up to 1 hour in the dark prior to reading.

Results

For the assay to be valid, the Negative Control mean ($\text{NC}\bar{x}$) must be greater than or equal to 0.800. In addition, the S/N percentage of the Positive Control should be less than 20%.

NOTE: IDEXX has instrument and software systems available which calculate means and % values and provide data summaries.

Calculation

Negative Control Mean

$$NC\bar{x} = \frac{NC1 A_{450} + NC2 A_{450}}{2}$$

Calculation for test samples

$$S/N (\%) = 100 \times \frac{\text{Sample } A_{450}}{NC\bar{x}}$$

Interpretation of Results

Serum samples

BVD/MD diagnostic for bovine Individual Serum and Plasma samples and BD diagnostic for individual serum and plasma and pooled serum samples from sheep:

- Samples with S/N % greater than or equal to 50 % are considered Negative.
- Samples with S/N % greater than 40 % and less than 50 % are considered doubtful and must be retested.
- Samples with S/N % less than or equal to 40 % should be considered Positive.

BVD/MD diagnostic for bovine Pool of Serum samples :

- Samples with S/N % greater than or equal to 60 % are considered Negative.
- Samples with S/N % greater than 50 % and less than 60 % are considered doubtful and must be retested.
- Samples with S/N % less than or equal to 50 % should be considered Positive.

Notes:

- Positive pools should be confirmed by analyzing the individual samples composing the pool.
- Analysis of pools of serum samples is not applicable in Germany.

Milk samples

Qualitative interpretation - BVD/MD diagnostic for bovine Individual and Tank Milk samples:

- Individual and Tank Milk Samples with S/N % greater than or equal to 80 % are considered as samples coming from a negative animal or herd.
- Individual and Tank Milk Samples with S/N % less than 80 % should be considered as samples coming from an animal or herd which has been in contact with BVDV/MD.

Semi-quantitative interpretation - BVD/MD diagnostic for bovine Tank Milk samples:

- Samples with S/N % greater than or equal to 80 % are considered as coming from a herd with less than 10 % BVD/MD within herd sero-prevalence.
- Samples with S/N % greater than 45 % and less than 80 % are considered as coming from a herd with a 10 % to 30 % BVD/MD within herd sero-prevalence.
- Samples with S/N % less than or equal to 45 % are considered from herd with BVD/MD prevalence greater than 30 %.

Note:

- Analysis of Tank milk samples is not applicable in Germany.

👁 = *Modification in the using instructions*

Summarized Test Procedure

IDEXX strongly recommends that you read the complete instructions carefully before using the test the first time.

Steps	Action
1. Preparation of reagents	Wash Concentrate (20X) must be diluted 1:20 with distilled/deionized water before use Concentrated Conjugate must be diluted 1: 100 in the Dilution Buffer N. 1
2. Distribution and incubation of samples	<p>1. Dispense Dilution Buffer N. 9 Controls and samples:</p> <p><u>Bovine Individual Serum and Plasma samples: Short incubation [1 hour (\pm 5 min.) at 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in each well. • Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells. • Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well. • Dispense 50 μL of sample into remaining wells (1 well per sample). • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate and incubate for 1 hour (\pm 5 min.) at 18–26°C. <p><u>Bovine Individual Serum and Plasma samples: Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 90 μL of Dilution Buffer N.9 in each well. • Dispense 10 μL of Negative Control into two appropriate wells. • Dispense 10 μL of Positive Control into one appropriate well. • Dispense 10 μL of sample into remaining wells (1 well per sample) • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate and incubate for 16–24 hours at 2–8°C. <p><u>Bovine Pool Serum samples (Maximum 10): Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in each well. • Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells. • Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well. • Dispense 50 μL of sample into remaining wells (1 well per sample) • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate and incubate for 16–24 hours at 2–8°C. <p><u>Bovine Individual and Tank Milk samples: Short incubation [2 hours (\pm 5 min.) at 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in three appropriate wells. • Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells (containing 50 μL of Dilution Buffer N.9). • Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well (containing 50 μL of Dilution Buffer N.9). • Dispense 100 μL of sample into remaining wells (1 well per sample). • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate and incubate for 2 hours (\pm 5 min) at 18–26°C. <p><u>Bovine Individual and Tank Milk samples : Overnight incubation [16–24 hours at 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 100 μL of Dilution Buffer N.9 in each well. • Dispense 100 μL of Negative Control into two appropriate wells. • Dispense 100 μL of Positive Control into one appropriate well. • Dispense 100 μL of sample into remaining wells (1 well per sample). • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate and incubate for 16–24 hours at 18–26°C. <p><u>Sheep Individual Serum and Plasma samples and Pool of Serum samples (Maximum 5): Overnight incubation [16–24 hours at 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispense 50 μL of Dilution Buffer N.9 in three appropriate wells. • Dispense 75 μL of Dilution Buffer N. 9 in remaining wells. • Dispense 50 μL of Negative Control into two appropriate wells (containing 50 μL of Dilution Buffer N. 9). • Dispense 50 μL of Positive Control into one appropriate well (containing 50 μL of Dilution Buffer N.9). • Dispense 25 μL of sample per well (containing 75 μL of Dilution Buffer N. 9) • Homogenize contents of the wells using a microplate shaker. • Cover the microplate (with a lid, aluminium foil or adhesive plate cover) and incubate for 16–24 hours at 2–8°C.



3. Washing the plate	Wash each well with approximately 300 μ L of Wash Solution 3 to 5 times.
4. Conjugate distribution	Dispense 100 μ L of diluted Conjugate into each well.
5. Conjugate incubation	Cover the microplate and incubate for 30 minutes (\pm 3 min.) at 18–26°C.
6. Washing the plate	Wash each well with approximately 300 μ L of Wash Solution 3 times.
7. Substrate distribution	Dispense 100 μ L of TMB Substrate N.9 into each well.
8. Substrate incubation	Incubate 20 minutes (\pm 3 min.) at 18–26°C in a dark place.
9. Stopping the reaction	Dispense 100 μ L of Stop Solution N.3 into each well.
10. Measure the plate	Blank the microplate reader on air. Measure and record Optical Densities values of samples and Controls at 450 nm. Calculate results.
11. Interpretation (S/N percentage)	<p>Serum samples</p> <p>BVD/MD diagnostic for bovine Individual Serum and Plasma samples and BD diagnostic for individual serum and plasma and pooled serum samples from sheep:</p> <ul style="list-style-type: none">• Samples with S/N % greater than or equal to 50 % are considered Negative.• Samples with S/N % greater than 40 % and less than 50 % are considered doubtful and must be retested.• Samples with S/N % less than or equal to 40 % should be considered Positive. <p>BVD/MD diagnostic for bovine Pool of Serum samples :</p> <ul style="list-style-type: none">• Samples with S/N % greater than or equal to 60 % are considered Negative.• Samples with S/N % greater than 50 % and less than 60 % are considered doubtful and must be retested.• Samples with S/N % less than or equal to 50 % should be considered Positive. <p>Milk samples</p> <p>Qualitative interpretation - BVD/MD diagnostic for bovine Individual and Tank Milk samples:</p> <ul style="list-style-type: none">• Individual and Tank Milk Samples with S/N % greater than or equal to 80 % are considered as samples coming from a negative animal or herd.• Individual and Tank Milk Samples with S/N % less than 80 % should be considered as samples coming from an animal or herd which has been in contact with BVDV/MD. <p>Semi-quantitative interpretation - BVD/MD diagnostic for bovine Tank Milk samples:</p> <ul style="list-style-type: none">• Samples with S/N % greater than or equal to 80 % are considered as coming from a herd with less than 10 % BVD/MD within herd sero-prevalence.• Samples with S/N % greater than 45 % and less than 80 % are considered as coming from a herd with a 10 % to 30 % BVD/MD within herd sero-prevalence.• Samples with S/N % less than or equal to 45 % are considered from herd with BVD/MD prevalence greater than 30 %.

Manufactured by:

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra – Parc Euromédecine
34090 Montpellier, France

For technical assistance:

Contact your IDEXX area manager or distributor
or visit: www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

*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.

Kit de détection des Anticorps dirigés contre la protéine p80 du BVDV/MD/BDV

Réservé à l'usage vétérinaire

Définition et application

IDEXX BVDV p80 Ab est un test immunoenzymatique pour la détection des anticorps dirigés contre la Protéine p80 pour le diagnostic du Virus Diarrhée Virale Bovine (BVDV) et du Virus de la Maladie des Muqueuses (MD) à partir d'échantillons individuels de sérum, plasma et lait bovins et à partir de mélanges de sérums bovins (maximum 10) et de laits de tank bovins, ainsi que pour le diagnostic de la Border Disease (BD) à partir d'échantillons individuels de sérums et plasmas ovins et à partir de mélanges de sérums ovins (maximum 5).

Informations Générales

Le virus BVDV est un pestivirus responsable de deux maladies : la diarrhée virale bovine (BVD) et la maladie des muqueuses (MD). La Diarrhée Virale Bovine est une pathologie induite par l'infection par l'un des deux biotypes du virus (cytopathogène et non cytopathogène). La forme aiguë, qui se traduit par un épisode fébrile accompagné de diarrhées, est transitoire avec une morbidité élevée et une mortalité faible. La contamination des animaux adultes peut aussi présenter une forme sub-clinique sans symptôme. La Maladie des Muqueuses est de morbidité faible (1%) mais de mortalité élevée. Elle se manifeste le plus fréquemment, par des jetages séro-muqueux, des ulcérations à différents niveaux du tractus digestif, des diarrhées souvent hémorragiques. De nombreuses pathologies sont associées ou aggravées par l'infection par le BVDV. Il s'agit entre autres, de maladies respiratoires, de retard de croissance, de malformations congénitales, etc... La Maladie des Muqueuses apparaît chez les bovins nés Infectés Permanents Immunotolérants (I.P.I.). Les I.P.I. sont des animaux qui ont été infectés par une souche non cytopathogène par voie transplacentaire entre le 42^{ème} et le 120^{ème} jour de gestation. Cette période correspond à l'acquisition de la tolérance immunitaire du fœtus: les antigènes étrangers présents à ce moment sont considérés comme éléments du soi et aucune réponse immunitaire n'est développée contre eux. Les IPI ne produisent donc pas d'anticorps contre la souche qu'ils hébergent. La Maladie des Muqueuses est induite chez l'animal I.P.I. par une mutation de la souche non cytopathogène en souche cytopathogène. Les principales sources d'infection sont les animaux I.P.I. qui sont porteurs et excréteurs permanents du virus et, de manière transitoire (pendant 10 jours), les individus primo-infectés récemment par le BVDV. La transmission du virus peut être oronasale, conjonctivale, génitale ou transplacentaire. Le dépistage immunologique permet de détecter la présence du BVDV dans un cheptel par la mise en évidence d'animaux porteurs d'anticorps spécifiques. Il ne permet cependant pas de détecter d'éventuels individus I.P.I.. Historiquement basé sur des méthodes de séroneutralisation, ce dépistage immunologique est actuellement réalisé par méthode ELISA. Cette méthode est en effet de mise en oeuvre rapide, fiable et se prête particulièrement bien à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons et peut être utilisée sur le lait de tank. Elle est basée sur un principe de compétition entre des anticorps bovins et un anticorps monoclonal « WB112 » anti-p80 marqué à la peroxydase. Ce kit permet la détection immunoenzymatique des Anticorps dirigés contre la protéine p80 pour le diagnostic du Virus Diarrhée Virale Bovine (BVDV) et du Virus de la Maladie des Muqueuses (MD) à partir d'échantillons individuels de sérum, plasma et lait bovins et à

partir de mélanges de sérums bovins (maximum 10) et de laits de tank bovins, ainsi que pour le diagnostic de la Border Disease (BD) à partir d'échantillons individuels de sérums et plasmas ovins et à partir de mélanges de sérums ovins (maximum 5).

Description et principe

Les microplaques sont sensibilisées avec la protéine p80 par l'intermédiaire d'un anticorps WB103 spécifique. Les échantillons à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits de la microplaque sensibilisée. En présence d'anticorps spécifiques de la protéine p80 dans l'échantillon à tester, il se forme des immun-complexes protéine p80-anticorps. Après lavage, un Conjugué immunoglobuline anti-protéine p80 couplé à une enzyme est mis à incuber. En présence de l'immun-complexe protéine p80-anticorps, le Conjugué ne peut pas se fixer sur la phase solide. En l'absence d'anticorps spécifiques de la protéine p80 dans l'échantillon à tester, le Conjugué se fixe sur les sites antigéniques disponibles de la phase solide. Après lavage, le Substrat de l'enzyme (TMB) est distribué dans les puits. En présence d'enzyme, le Substrat est oxydé et développe une coloration bleue virant au jaune après distribution de la Solution d'arrêt. L'intensité de la coloration qui en résulte est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-p80 présente dans l'échantillon à tester (se reporter aux paragraphes « calculs » et « interprétation des résultats »).

Le diagnostic est établi en comparant la Densité Optique de l'échantillon à la Densité Optique moyenne du Contrôle négatif (se reporter aux paragraphes « calculs » et « interprétation des résultats »).

Réactifs

Stocker tous les réactifs à 2–8°C.

Réactifs	Quantité	
1	Plaques sensibilisées avec la protéine p80 du BVD/MD/BDV	5
2	Contrôle positif	2 ml
3	Contrôle négatif	2 ml
4a	Conjugué concentré (Anti-p80 HRPO)	0,75 ml
4b	Tampon de dilution N°1	120 ml
5	Tampon de dilution N°9	120 ml
A	Substrat TMB N°9	60 ml
B	Solution d'arrêt N°3	60 ml
C	Solution de lavage concentrée (20X)	100 ml

REMARQUE: voir le tableau page 45 pour la description des symboles internationaux utilisés sur les étiquettes du kit.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Centrifugeuse à 2000 x g
- Vortex ou équivalent
- Micropipettes et multicanaux (la précision requise pour la mesure des volumes indiqués au « Mode Opérateur » doit être inférieure ou égale à 5%)
- Embouts de pipettes à usage unique
- Agitateur de microplaques
- Eau distillée ou déionisée
- Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique
- Couvre-cles pour microplaques, aluminium ou adhésifs
- Lecteur de microplaques équipé d'un filtre à 450 nm

Mises en garde et précautions d'emploi

- Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
- Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
- Les Contrôles, le Substrat TMB et la Solution de lavage concentrée (20X) peuvent provoquer des irritations des yeux.
- La Solution d'arrêt provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- Décontaminer l'ensemble du matériel intervenant dans la manipulation avant élimination. Éliminer l'ensemble du matériel selon les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.

Préparation des réactifs

Solution de lavage

Diluer la Solution de lavage concentrée (20X) au 1/20 dans de l'eau distillée/déionisée avant utilisation (ex. : 15 ml de Solution de lavage concentrée (20X) dans 285 ml d'eau distillée). Cette solution est désignée par la suite "Solution de lavage".

Note: Remettre la Solution de lavage concentrée (20X) à 18–26°C et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La Solution de lavage est stable pendant trois jours à 2–8°C.

Conjugué

Diluer le Conjugué concentré au 1/100 dans le Tampon de dilution N°1.

Note: Le Conjugué dilué est stable pendant 8 heures à 18–26°C.

Echantillons de lait

Les échantillons de lait écrémés et de lait entiers peuvent être testés.

Mode Opérateur

Les Contrôles peuvent être déposés n'importe où sur la microplaque.

Réserver le nombre de microplaque(s) sensibilisée(s) nécessaire(s) à la manipulation. Établir le(s) plan(s) de microplaque(s) correspondant(s).

Porter tous les réactifs à 18–26°C avant utilisation et bien homogénéiser par agitation douce ou au vortex. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.

1. Distribuer le Tampon de dilution N°9, les Contrôles et les Echantillons :

a) Echantillons individuels de sérums et plasmas bovins: Incubation courte [1 heure (\pm 5 min.) à 18–26°C]

- Distribuer 50 μ l du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 50 μ l de Contrôle négatif dans deux puits appropriés.
- Distribuer 50 μ l de Contrôle positif dans un puits approprié.
- Distribuer 50 μ l de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 1 heure (\pm 5 min.) à 18–26°C.

b) Echantillons individuels de sérums et plasmas bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]

- Distribuer 90 μ l du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 10 μ l de Contrôle négatif dans deux puits appropriés.
- Distribuer 10 μ l de Contrôle positif dans un puits approprié.
- Distribuer 10 μ l de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 16–24 heures à 2–8°C.

c) Mélanges de sérums bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]

- Distribuer 50 μ l du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 50 μ l de Contrôle négatif dans deux puits appropriés.
- Distribuer 50 μ l de Contrôle positif dans un puits approprié.
- Distribuer 50 μ l de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 16–24 heures à 2–8°C.

Note: l'analyse sur mélanges de sérums n'est pas applicable en Allemagne.

d) Echantillons de laits individuels et Laits de tank bovins: Incubation courte [2 heures (\pm 5 min.) à 18–26°C]

- Distribuer 50 μ l du Tampon de dilution N°9 dans trois puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 50 μ l de Contrôle négatif dans deux puits appropriés (contenant 50 μ l de Tampon de dilution N°9).
- Distribuer 50 μ l de Contrôle positif dans un puits approprié (contenant 50 μ l de Tampon de dilution N° 9).
- Distribuer 100 μ l de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 2 heures (\pm 5 min.) à 18–26°C.

Note: l'analyse sur mélanges de laits n'est pas applicable en Allemagne.

e) Echantillons de laits individuels et Laits de tank bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 18–26°C]

- Distribuer 100 μl du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 100 μl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés.
- Distribuer 100 μl de Contrôle positif dans un puits approprié.
- Distribuer 100 μl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 16–24 heures à 18–26°C.

Note: l'analyse sur mélanges de laits n'est pas applicable en Allemagne.

f) Echantillons individuels de sérums et plasmas, et Mélanges de sérums (maximum 5) ovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]

- Distribuer 50 μl du Tampon de dilution N°9 dans trois puits de la microplaque sensibilisée.
- Distribuer 75 μl du Tampon de dilution N°9 dans les puits adjacents disponibles.
- Distribuer 50 μl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés (contenant 50 μl de Tampon de dilution N° 9).
- Distribuer 50 μl de Contrôle positif dans un puits approprié (contenant 50 μl de Tampon de dilution N° 9).
- Distribuer 25 μl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (contenant 75 μl de Tampon de dilution N°9) (1 puits par échantillon).
- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- Couvrir la microplaque (couvercle, papier aluminium ou adhésif) et incuber 16–24 heures à 2–8°C.

Note: l'analyse sur mélanges de sérums n'est pas applicable en Allemagne.

- ☞ 2. Laver 3 à 5 fois chaque puits avec approximativement 300 μl la Solution de lavage. Aspirer la Solution de lavage contenue dans la microplaque entre chaque lavage. Après la dernière aspiration consécutive au dernier lavage, éliminer le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la microplaque sur du papier absorbant. Eviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du réactif suivant.

Note : Si les laits sont écrémés (ou prélevés sous la crème), ce type de lavage est suffisant. Avec les laits non écrémés, il est recommandé de modifier cette méthode de lavage en laissant la solution de lavage en contact 1 minute à chaque lavage. Ce temps de contact permet l'élimination des particules grasses susceptibles de fixer de façon non spécifique le conjugué à l'étape suivante. Un lavage soigné est essentiel pour obtenir des résultats optimaux.

3. Distribuer 100 μl de Conjugué dilué par puits.
4. Couvrir la microplaque (couvercle, aluminium ou adhésif) et incuber 30 minutes (\pm 3 min.) à 18–26°C.
5. Laver 3 fois chaque puits avec approximativement 300 μl la Solution de lavage. Aspirer la Solution de lavage contenue dans la microplaque entre chaque lavage. Après la dernière aspiration consécutive au dernier lavage, éliminer le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la microplaque sur du papier absorbant. Eviter la dessiccation des puits de la microplaque entre les lavages et préalablement à la distribution du réactif suivant.
6. Distribuer 100 μl de Substrat TMB N°9 par puits.

7. Incuber 20 minutes (\pm 3 min.) à 18–26°C à l'abri de la lumière.
8. Distribuer 100 μ l de Solution d'arrêt N°3 par puits. Bien homogénéiser le contenu de la microplaque par tapotement. Essuyer soigneusement le dessous de la microplaque.
9. Faire le blanc du lecteur de microplaques sur l'air.
10. Enregistrer les Densités Optiques des Echantillons et des Contrôles à l'aide d'un lecteur de microplaques en monochromatisme à 450nm.
11. Calculer les résultats.

Notes: Lors de l'utilisation de robots, l'incubation des microplaques en chambre d'incubation permet de s'affranchir de l'utilisation de couvercles. De même, les étapes de tapotement et d'essuyage des microplaques sont incompatibles avec ces derniers.

La lecture peut se faire jusqu'à 1 heure après distribution de la Solution d'arrêt N°3 à condition de conserver les microplaques à l'obscurité.

Résultats

La réaction est validée si la valeur moyenne de Densité Optique du Contrôle négatif ($CN\bar{x}$) est supérieure ou égale à 0,800 et si le rapport entre la valeur de Densité Optique du Contrôle positif et la valeur moyenne de Densité Optique du Contrôle négatif ($CN\bar{x}$) est inférieure à 20%.

Note: IDEXX Laboratories Inc. met à votre disposition l'équipement de laboratoire et le logiciel pour l'enregistrement des données, le calcul et l'interprétation des résultats.

Calculs

Calculer pour chaque échantillon le pourcentage E/N.

Calcul de la valeur moyenne de densité optique du Contrôle négatif

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A_{450} + CN2 A_{450}}{2}$$

Calcul du pourcentage E/N (%) pour chaque échantillon

$$E/N (\%) = 100 \times \frac{\text{Échantillon } A_{450}}{CN\bar{x}}$$

Interprétation

Echantillons de sérum:

Diagnostic BVD/MD des bovins sur échantillons individuels de sérum et plasma et diagnostic BD des ovins sur échantillons individuels de sérum et plasma et mélanges de sérums:

- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 50 % est considéré comme Négatif.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 40 % et inférieur à 50 % est considéré douteux et doit être retesté.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 40 % est considéré comme Positif.

Mélanges de sérums (diagnostic BVD/MD des bovins):

- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 60 % est considéré comme Négatif.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 50 % et inférieur à 60 % est considéré douteux et doit être retesté.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 50 % est considéré comme Positif.

Note: l'analyse sur mélanges de sérums n'est pas applicable en Allemagne.

Echantillons de lait:

Interprétation qualitative - Diagnostic BVD/MD des bovins sur échantillons individuels de lait et laits de tank:

- Tout échantillon de lait individuel ou de lait de tank dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 80 % est considéré comme issu d'un animal ou d'un troupeau négatif.
- Tout échantillon de lait individuel ou de lait de tank dont le pourcentage E/N est inférieur à 80 % est considéré issu d'un animal ou d'un troupeau ayant été en contact avec le BVD/MD.

Interprétation semi-quantitative - Diagnostic BVD/MD des bovins sur laits de tank :

- Tout échantillon de lait de tank dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 80 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD inférieure à 10 %.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 45 % et inférieur à 80 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD comprise entre 10 % et 30 %.
- Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 45 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD supérieure à 30 %.

Note: l'analyse sur mélanges de laits n'est pas applicable en Allemagne.

👁 = *Modification du mode d'emploi*

Résumé du Mode opératoire

Avant la première mise en œuvre du test, il est vivement recommandé de lire l'ensemble du mode opératoire.

Etape	Action
1. Préparation des réactifs	<p>Diluer la Solution de lavage concentrée (20X) au 1/20 dans de l'eau distillée/déionisée avant utilisation. Diluer le Conjugué concentré au 1/100 dans le Tampon de dilution N°1.</p>
2. Distribution et incubation des échantillons	<p><u>Echantillons individuels de sérums et plasmas bovins: Incubation courte [1 heure (± 5 min.) à 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 50 µl du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 50 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés. • Distribuer 50 µl de Contrôle positif dans un puits approprié. • Distribuer 50 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque et incuber 1 heure (± 5 min.) à 18–26°C. <p><u>Echantillons individuels de sérums et plasmas bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 90 µl du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 10 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés. • Distribuer 10 µl de Contrôle positif dans un puits approprié. • Distribuer 10 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque et incuber 16–24 heures à 2–8°C. <p><u>Mélanges de sérums bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 50 µl du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 50 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés. • Distribuer 50 µl de Contrôle positif dans un puits approprié. • Distribuer 50 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque et incuber 16–24 heures à 2–8°C. <p><u>Echantillons de laits individuels et Laits de tank bovins: Incubation courte [2 heures (± 5 min.) à 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 50 µl du Tampon de dilution N°9 dans trois puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 50 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés (contenant 50 µl de Tampon de dilution N°9). • Distribuer 50 µl de Contrôle positif dans un puits approprié (contenant 50 µl de Tampon de dilution N°9). • Distribuer 100 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque et incuber 2 heures (± 5 min.) à 18–26°C. <p><u>Echantillons de laits individuels et Laits de tank bovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 100 µl du Tampon de dilution N°9 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 100 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés. • Distribuer 100 µl de Contrôle positif dans un puits approprié. • Distribuer 100 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque et incuber 16–24 heures à 18–26°C. <p><u>Echantillons individuels de sérums et plasmas, et Mélanges de sérums (maximum 5) ovins: Incubation de nuit [16–24 heures à 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 50 µl du Tampon de dilution N°9 dans trois puits de la microplaque sensibilisée. • Distribuer 75 µl du Tampon de dilution N°9 dans les puits adjacents disponibles. • Distribuer 50 µl de Contrôle négatif dans deux puits appropriés (contenant 50 µl de Tampon de dilution N°9). • Distribuer 50 µl de Contrôle positif dans un puits approprié (contenant 50 µl de Tampon de dilution N°9). • Distribuer 25 µl de chaque échantillon à tester dans les puits disponibles adjacents (contenant 75 µl de Tampon de dilution N°9) (1 puits par échantillon). • Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques. • Couvrir la microplaque (couverture, papier aluminium ou adhésif) et incuber 16–24 heures à 2–8°C.

3. Lavage des plaques	Laver 3 à 5 fois chaque puits avec approximativement 300 μ l la Solution de lavage.
4. Distribution du Conjugué	Distribuer 100 μ l de Conjugué dilué par puits.
5. Incubation du Conjugué	Couvrir la microplaque et incuber 30 minutes (\pm 3 min.) à 18–26°C.
6. Lavage des plaques	Laver 3 fois chaque puits avec approximativement 300 μ l la Solution de lavage.
7. Distribution du Substrat	Distribuer 100 μ l de Substrat TMB N°9 par puits.
8. Incubation du Substrat	Incuber 20 minutes (\pm 3 min.) à 18–26°C à l'abri de la lumière.
9. Arrêt de la réaction	Distribuer 100 μ l de Solution d'arrêt N°3 par puits.
10. Lecture de la plaque	Faire le blanc du lecteur de microplaques sur l'air. Enregistrer les Densités Optiques des Echantillons et des Contrôles à l'aide d'un lecteur de microplaques en monochromatisme à 450nm. Calculer les résultats.
11. Interpretation (E/N %)	<p>Echantillons de sérum: Diagnostic BVD/MD des bovins sur échantillons individuels de sérum et plasma et diagnostic BD des ovins sur échantillons individuels de sérum et mélanges de sérums:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 50 % est considéré comme Négatif. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 40 % et inférieur à 50 % est considéré douteux et doit être retesté. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 40 % est considéré comme Positif. <p>Mélanges de sérums (diagnostic BVD/MD des bovins):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 60 % est considéré comme Négatif. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 50 % et inférieur à 60 % est considéré douteux et doit être retesté. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 50 % est considéré comme Positif. <p>Echantillons de lait: Interprétation qualitative - Diagnostic BVD/MD des bovins sur échantillons individuels de lait et laits de tank:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tout échantillon de lait individuel ou de lait de tank dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 80 % est considéré comme issu d'un animal ou d'un troupeau négatif. • Tout échantillon de lait individuel ou de lait de tank dont le pourcentage E/N est inférieur à 80 % est considéré issu d'un animal ou d'un troupeau ayant été en contact avec le BVD/MD. <p>Interprétation semi-quantitative - Diagnostic BVD/MD des bovins sur laits de tank :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tout échantillon de lait de tank dont le pourcentage E/N est supérieur ou égal à 80 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD inférieure à 10 %. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est supérieur à 45 % et inférieur à 80 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD comprise entre 10 % et 30 %. • Tout échantillon dont le pourcentage E/N est inférieur ou égal à 45 % est considéré comme issu d'un troupeau à séro-prévalence BVD/MD supérieure à 30 %.

Fabricant:

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra – Parc Euromédecine
34090 Montpellier – France

Pour toute assistance technique:

Contactez votre représentant local IDEXX
ou visitez: www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

*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.

Kit para Detecção de Anticorpos Anti-p80 contra BVDV/MD/BDV

Para uso exclusivamente veterinário.

Nome e Indicações

IDEXX BVDV p80 Ab é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de anticorpos direcionados contra a proteína p80 para o diagnóstico do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) e da Doença das Mucosas (MD) em amostras individuais de soro, plasma e leite de bovinos e em pools de amostras de soro de bovinos (máximo de 10) e em pools de leite bovinos, e para o diagnóstico da Doença das Fronteiras (BD) em amostras individuais de soro e de plasma e em pools de amostras de soro (máximo de 5) de ovinos.

Informações gerais

O Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é um pestivírus que causa duas doenças: a Diarréia Viral Bovina (BVD) e a Doença das Mucosas (MD). A Diarréia Viral Bovina é uma patologia induzida por uma das duas cepas do vírus (citopatogênica e não citopatogênica). A forma aguda, caracterizada por febre e diarréia, é passageira, com altas taxas de morbidade e baixas taxas de mortalidade. Animais adultos também podem ser infectados com uma forma subclínica assintomática. A Doença das Mucosas tem baixas taxas de morbidade (1%), mas altas taxas de mortalidade. Frequentemente ela é caracterizada por úlceras, de diferentes níveis, do trato digestivo e por diarréia normalmente hemorrágica. Muitas patologias são associadas com o BVDV ou agravadas pelo vírus, incluindo, entre outras, doenças respiratórias, desenvolvimento lento, defeitos congênitos, etc. A doença das mucosas ocorre em bezerros infectados durante a gestação (animais imunotolerantes e persistentemente infectados). Estes animais foram infectados com uma cepa não citopatogênica por via transplacentária entre o 42º e o 120º dia da gestação. Durante este espaço de tempo, a imunocompetência se desenvolve no feto: antígenos estranhos presentes durante este período são considerados como antígenos próprios e não há desenvolvimento de resposta imunológica contra eles. Em consequência, os animais persistentemente infectados não produzem anticorpos contra a cepa com a qual eles estão infectados. A doença das mucosas é induzida pela mutação da cepa não citopatogênica para uma cepa citopatogênica. As principais fontes de infecção são animais I.P.I., que produzem e segregam continuamente o vírus e, durante um espaço de tempo limitado (durante 10 dias), animais recentemente contaminados com uma infecção primária com o BVDV. A transmissão do vírus pode ser oral, nasal, conjuntival, genital ou transplacentária. A presença do BVDV em um rebanho pode ser detectada através da triagem sorológica que revela a presença de animais com anticorpos específicos. No entanto, ela não possibilita a detecção de animais persistentemente infectados. Baseado anteriormente em métodos de soroneutralização, este novo teste de triagem sorológica usa o método ELISA. Este teste pode ser implementado rapidamente, é confiável e particularmente adequado para a análise de um grande número de amostras, podendo ser usado para a análise de leite de tanque. Ele baseia-se no princípio da competição entre os anticorpos bovinos e um anticorpo monoclonal ligado a peroxidase anti-p80 "WB112".

Este kit foi desenvolvido para detectar anticorpos direcionados contra a proteína p80 para o diagnóstico do Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) e da Doença das Mucosas (MD) em amostras individuais de soro, plasma e leite de bovinos e em pools de amostras de soro e de plasma de

bovinos (máximo de 10) e em pools de leite bovinos e para o diagnóstico da Doença das Fronteiras (BD) em amostras individuais de soro e de plasma e em pools de amostras de soro (máximo de 5) de ovinos.

Descrição e Princípios

Placas são recobertas com a proteína p80 ligada aos cavidades por um anticorpo específico WB103. As amostras são diluídas e incubadas nas cavidades de placas impregnadas. Durante a incubação da amostra de teste nas cavidades impregnadas, os anticorpos específicos da proteína p80 formam um complexo imune anticorpo-antígeno. Após a remoção por lavagem do material não ligado, é adicionado um Conjugado de enzima-Proteína G que se liga a qualquer complexo imune antígeno-anticorpo. O Conjugado não ligado é removido por lavagem e é adicionado um Substrato de enzima (TMB). Na presença da enzima, o Substrato é oxidado e desenvolve um composto azul que se transforma em amarelo após o bloqueio. O subsequente desenvolvimento da cor está diretamente relacionado à quantidade de anticorpos presente na amostra de teste. A relevância diagnóstica do resultado é obtida através da comparação da densidade ótica da amostra com a densidade ótica da média do Controle Positivo (ver “Cálculos” e “Interpretação de resultados”).

Reagentes

Armazene todos os reagentes entre 2–8°C.

Reagentes	Quantidade	
1	Placas Impregnadas com Proteína p80 contra o BVDV/MD/BDV	5
2	Controle Positivo	2 ml
3	Controle Negativo	2 ml
4a	Conjugado Concentrado (anti-p80 HRPO)	0,75 ml
4b	Tampão de Diluição No.1	120 ml
5	Tampão de Diluição No.9	120 ml
A	Substrato TMB No.9	60 ml
B	Solução de Interrupção No.3	60 ml
C	Concentrado de Lavagem (20X)	100 ml

NOTA: veja a tabela na página 45 para descrição dos símbolos internacionais usados nos rótulos dos kits.

Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

- Centrífuga (capacidade de 2000 x g)
- Vortex o equivalente
- Micropipetas de precisão e micropipetas multicanal (os volumes de reagentes listados no "Protocolo de Teste" exigem pipetas com precisão inferior ou igual a 5%)
- Pontas de pipetas descartáveis
- Agitador de placas
- Água destilada ou água deionizada
- Lavadora de placas (sistema manual, semiautomático ou automático)
- Coberturas para a placa (tampa, folha de alumínio ou cobertura adesiva)
- Leitora de placas de 96 cavidades equipada com filtro 450 nm

Precauções e Advertências aos Usuários

- Não pipetar com a boca.
- Usar luvas de proteção / roupa protetora / proteção para os olhos / proteção para o rosto.
- Os Controles, o Substrato TMB e as soluções do Concentrado de Lavagem podem causar irritação aos olhos.
- A Solução de Interrupção pode causar graves queimaduras na pele e danos aos olhos.
- Todos os resíduos devem ser devidamente descontaminados antes da sua destinação final. Eliminar os resíduos de acordo com as disposições locais, regionais e nacionais.

Preparação dos reagentes

Solução de Lavagem

O Concentrado de Lavagem (20X) deve ser diluído em uma proporção de 1:20 com água destilada / deionizada antes do uso (por. ex. 15 ml de Concentrado de Lavagem (20X) em 285 ml de água destilada).

Esta solução é denominada a seguir de "Solução de Lavagem".

Nota: O Concentrado de Lavagem (20X) deve alcançar a 18–26°C e estar bem misturado para garantir a dissolução de quaisquer sais precipitados.

A Solução de Lavagem é estável por até 3 dias se armazenada a temperatura de 2–8°C.

Conjugado

Diluir o Conjugado Concentrado 1/100 com o Tampão de Diluição No.1.

Nota: A solução do Conjugado diluído é estável por até 8 horas a 18–26°C.

Amostras de leite

Amostras de leite bovino desnatado ou não desnatado podem ser testados.

Protocolo do teste

Os reagentes devem estar a 18–26°C antes do uso. Homogeneiza-los através de inversão com movimentos circulares suaves.

Os Controles podem ser adicionados em qualquer lugar da placa.

Obter as placas impregnadas e registrar a posição de cada uma das amostras em uma folha de trabalho.

1. Adicionar Tampão de Diluição No.9, amostras e Controles:

a) Amostras individuais de soro e plasma de bovinos: incubação curta [1 hora. (± 5 min.) a 18–26°C]

- Adicionar 50 μ l de Tampão de Diluição No.9 na cavidade.
- Adicionar 50 μ l de Controle Negativo em duas cavidades.
- Adicionar 50 μ l de Controle Positivo em uma cavidade.
- Adicionar 50 μ l de cada amostra nos orifícios que sobraram.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 1 hora. (± 5 min.) a 18–26°C.

b) Amostras individuais de soro e plasma de bovinos: incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]

- Adicionar 90 μ l de Tampão de Diluição No.9 na cavidade.
- Adicionar 10 μ l de Controle Negativo em duas cavidades.
- Adicionar 10 μ l de Controle Positivo em uma cavidade.
- Adicionar 10 μ l de cada amostra nos orifícios que sobraram.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a micro-placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 16–24 horas a 2–8°C.

c) Pools de amostras de soro de bovinos (maximum 10): incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]

- Adicionar 50 μ l de Tampão de Diluição No.9 na cavidade.
- Adicionar 50 μ l de Controle Negativo em duas cavidades.
- Adicionar 50 μ l de Controle Positivo em uma cavidade.
- Adicionar 50 μ l de cada amostra nos orifícios que sobraram.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 16–24 horas a 2–8°C.

Nota: A análise dos pools de amostras de soro não são aprovados para uso na Alemanha.

d) Amostras individuais e pools de leite de bovinos: incubação curta [2 horas. (± 5 min.) a 18–26°C]

- Adicionar 50 μ l de Tampão de Diluição No.9 em tres cavidades.
- Adicionar 50 μ l de Controle Negativo em duas cavidades (contendo 50 μ l de Tampão de Diluição No.9).
- Adicionar 50 μ l de Controle Positivo em uma cavidade (contendo 50 μ l de Tampão de Diluição No.9).
- Adicionar 100 μ l de cada amostra nos orifícios que sobraram.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar 2 horas. (± 5 min.) a 18–26°C.

Nota: A análise dos pools de leite não são aprovados para uso na Alemanha.

e) Amostras individuais e pools de leite de bovinos: incubação longa [16–24 horas a 18–26°C]

- Adicionar 100 μl de Tampão de Diluição No.9 na cavidade.
- Adicionar 100 μl de Controle Negativo em duas cavidades.
- Adicionar 100 μl de Controle Positivo em uma cavidade.
- Adicionar 100 μl de cada amostra nos orifícios que sobraram.
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 16–24 horas a 18–26°C.

Nota: A análise dos pools de leite não são aprovados para uso na Alemanha.

f) Amostras individuais de soro e plasma e pools de amostras de soro de ovinos (max. 5): incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]

- Adicionar 50 μl de Tampão de Diluição No.9 em tres cavidades.
- Adicionar 75 μl de Tampão de Diluição No.9 nos orifícios que sobraram.
- Adicionar 50 μl de Controle Negativo em duas cavidades (contendo 50 μl de Tampão de Diluição No.9).
- Adicionar 50 μl de Controle Positivo em uma cavidade (contendo 50 μl de Tampão de Diluição No.9).
- Adicionar 25 μl de cada amostra na cavidade (contendo 75 μl de Tampão de Diluição No.9).
- Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas.
- Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar 16–24 horas a 2–8°C.

Nota: A análise dos pools de amostras de soro não são aprovados para uso na Alemanha.

- ☞ 2. Lavar 3 à 5 vezes cada cavidade com aproximadamente 300 μl de Solução de Lavagem. Após a aspiração final, remover bem o fluido de lavagem residual de cada placa com material absorvente. Evitar que a placa se seque entre as lavagens e antes da adição do próximo reagente.

Nota: Caso seja utilizado leite desnatado (ou leite retirado sob a camada de gordura), este tipo de lavagem é suficiente. Porém, se por feito o uso de leite integral, é recomendado uma modificação no método de lavagem com a adição de uma etapa de espera de 1 minuto por ciclo na etapa de lavagem. Isso facilita a eliminação de partículas de gordura que podem se ligar de forma não específica ao conjugado na próxima etapa. A lavagem completa é essencial para obtermos melhores resultados.

3. Adicionar 100 μl do Conjugado diluído em cada cavidade.
4. Cobrir a placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 30 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C.
5. Lavar 3 vezes cada cavidade com aproximadamente 300 μl de Solução de Lavagem. Após a aspiração final, remover bem o fluido de lavagem residual de cada placa com material absorvente. Evitar que a placa se seque entre as lavagens e antes da adição do próximo reagente.
6. Adicionar 100 μl do Substrato TMB No.9 em cada cavidade.
7. Incubar durante 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C em local escuro.
8. Adicionar 100 μl da Solução de Interrupção No.3 em cada cavidade. Agitar a placa batendo suavemente. Limpar cuidadosamente o lado inferior da placa.
9. Zerar a leitora com ar.
10. Medir e registrar os valores de densidade ótica das amostras e controles a 450 nm.
11. Calcular os resultados.

Notas: Quando os robôs utilizando, a incubação da placa na incubadora não precisa usar capas. Tenha cuidado para não bater ou sacudir a placa quando se usa um robô. As leituras podem ser feitas até uma hora após a distribuição da Solução Interrupção No.3, se as placas foram mantidas no escuro.

Resultados

Para garantir a validade do ensaio, a média do Controle Negativo ($CN\bar{x}$) deve ser superior ou equivalente a uma densidade ótica (OD) de 0,800. Além disso, a relação entre do Controle Positivo (CPx) e a média do Controle Negativo ($CN\bar{x}$) deve ser inferior a 20%.

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

Cálculos

Média do Controle Negativo

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A450 + CN2 A450}{2}$$

Relação para cada amostra

$$A/N (\%) = 100 \times \frac{\text{Amostra } A_{450}}{CN\bar{x}}$$

Interpretação de Resultados

Amostras de soro:

Diagnóstico do BVD/MD bovino em amostras individuais de soro e de plasma, e diagnóstico do MD ovino em amostras individuais de soro e de plasma e pools de amostras de soro:

- Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 50 % são consideradas Negativas.
- Amostras com uma relação A/N superior a 40 % e inferior a 50 % são consideradas suspeitas e devem ser testadas novamente.
- Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 40 % são consideradas Positivas.

Diagnóstico do BVDV/MD bovino em pools de amostras de soro:

- Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 60 % são consideradas Negativas.
- Amostras com uma relação A/N superior a 50 % e inferior a 60 % são consideradas suspeitas e devem ser testadas novamente.
- Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 50 % são consideradas Positivas.

Nota: Se um pool de amostras é positivo, recomenda-se testar individualmente as amostras utilizadas para preparar o pool.

Nota: A análise dos pools de amostras de soro não são aprovados para uso na Alemanha.

Amostras de leite:

Interpretação qualitativa - Diagnóstico do BVDV/MD bovino em amostras individuais e pools de leite:

- Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 80 % são consideradas Negativas.
- Amostras com uma relação A/N inferior a 80 % são consideradas Positivas.

Interpretação semi-quantitativa - Diagnóstico do BVDV/MD bovino em pools de leite:

- Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 80 % são consideradas considerados de rebanhos com prevalência de BVD/MD inferior a 10%.
- Amostras com uma relação A/N superior a 45 % e inferior a 80 % são consideradas de rebanhos com prevalência de BVD/MD entre 10% e 30%.
- Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 45 % são consideradas de rebanhos com prevalência de BVD/MD superior a 30%.

Nota: A análise dos pools de leite não são aprovados para uso na Alemanha.

👁 = *Modificação das instruções de utilização*

Resumo do Protocolo do teste

É extremamente recomendável que se leia cuidadosamente as informações completas, antes de usar o teste pela primeira vez.

Etapa	Ação
1. Preparação dos reagentes	<p>O Concentrado de Lavagem (20X) deve ser diluído em uma proporção de 1:20 com água destilada / deionizada antes do uso. Diluir o Conjugado concentrado 1/100 com o Tampão de Diluição No.1.</p>
2. Distribuição e incubação das Amostras	<p><u>Amostras individuais de soro e plasma de bovinos: incubação curta [1 hora (± 5 min.) a 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 50 µl de Tampão de Diluição No.9 na cavidade. • Adicionar 50 µl de Controle Negativo em duas cavidades. • Adicionar 50 µl de Controle Positivo em uma cavidade. • Adicionar 50 µl de cada amostra nos orifícios que sobraram. • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a placa e incubar por 1 hora (± 5 min.) a 18–26°C. <p><u>Amostras individuais e plasma de bovinos: incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 90 µl de Tampão de Diluição No.9 na cavidade. • Adicionar 10 µl de Controle Negativo em duas cavidades. • Adicionar 10 µl de Controle Positivo em uma cavidade. • Adicionar 10 µl de cada amostra nos orifícios que sobraram. • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a micro-placa e incubar por 16–24 horas a 2–8°C. <p><u>Pools de amostras de soro de bovinos (max.10): incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 50 µl de Tampão de Diluição No.9 na cavidade. • Adicionar 50 µl de Controle Negativo em duas cavidades. • Adicionar 50 µl de Controle Positivo em uma cavidade. • Adicionar 50 µl de cada amostra nos orifícios que sobraram. • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a placa e incubar por 16–24 horas a 2–8°C. <p><u>Amostras individuais e pools de leite de bovinos: incubação curta [2 horas. (± 5 min.) a 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 50 µl de Tampão de Diluição No.9 em tres cavidades. • Adicionar 50 µl de Controle Negativo em duas cavidades (contendo 50 µl de Tampão de Diluição No.9). • Adicionar 50 µl de Controle Positivo em uma cavidade (contendo 50 µl de Tampão de Diluição No.9). • Adicionar 100 µl de cada amostra nos orifícios que sobraram. • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a placa e incubar 2 horas (± 5 min.) à 18–26°C. <p><u>Amostras individuais e pools de leite de bovinos: incubação longa [16–24 horas a 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 100 µl de Tampão de Diluição No.9 na cavidade. • Adicionar 100 µl de Controle Negativo em duas cavidades. • Adicionar 100 µl de Controle Positivo em uma cavidade. • Adicionar 100 µl de cada amostra nos orifícios que sobraram. • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a placa e incubar por 16–24 horas a 18–26°C. <p><u>Amostras individuais de soro e plasma e pools de amostras de soro de ovinos (max. 5): incubação longa [16–24 horas a 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 50 µl de Tampão de Diluição No.9 em tres cavidades. • Adicionar 75 µl de Tampão de Diluição No.9 nos orifícios que sobraram. • Adicionar 50 µl de Controle Negativo em duas cavidades (contendo 50 µl de Tampão de Diluição No.9). • Adicionar 50 µl de Controle Positivo em uma cavidade (contendo 50 µl de Tampão de Diluição No.9). • Adicionar 25 µl de cada amostra na cavidade (contendo 75 µl de Tampão de Diluição No.9). • Homogeneizar o conteúdo das cavidades da placa com um agitador de placas. • Cobrir a placa e incubar 16–24 horas a 2–8°C.



3. Lavagem da Placa	Lavar 3 à 5 vezes cada cavidade com aproximadamente 300 μ l de Solução de Lavagem.
4. Distribuição do Conjugado	Adicionar 100 μ l do Conjugado diluído em cada cavidade.
5. Incubação do Conjugado	Cobrir a micro-placa (com uma tampa, uma folha de alumínio ou uma cobertura de placa adesiva) e incubar por 30 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°
6. Lavagem da Placa	Lavar 3 vezes cada cavidade com aproximadamente 300 μ l de Solução de Lavagem.
7. Distribuição do Substrato	Adicionar 100 μ l do Substrato TMB No.9 em cada cavidade.
8. Incubação do Substrato	Incubar durante 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C em local escuro.
9. Bloqueio da reação	Adicionar 100 μ l da Solução de Interrupção No.3 em cada cavidade.
10. Leitura da placa	Zerar a leitora com ar. Medir e registrar os valores de densidade ótica das amostras e controles a 450 nm. Calcular os resultados.
11. Interpretação (A/N %)	Amostras de soro: Diagnóstico do BVD/MD bovino em amostras individuais de soro e de plasma, e diagnóstico do MD ovino em amostras individuais de soro e de plasma e pools de amostras de soro: <ul style="list-style-type: none">• Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 50 % são consideradas Negativas.• Amostras com uma relação A/N superior a 40 % e inferior a 50 % são consideradas suspeitas e devem ser testadas novamente.• Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 40 % são consideradas Positivas. Diagnóstico do BVDV/MD bovino em pools de amostras de soro: <ul style="list-style-type: none">• Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 60 % são consideradas Negativas.• Amostras com uma relação A/N superior a 50 % e inferior a 60 % são consideradas suspeitas e devem ser testadas novamente.• Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 50 % são consideradas Positivas. Amostras de leite: Interpretação qualitativa - Diagnóstico do BVDV/MD bovino em amostras individuais e pools de leite: <ul style="list-style-type: none">• Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 80 % são consideradas Negativas.• Amostras com uma relação A/N inferior a 80 % são consideradas Positivas. Interpretação semi-quantitativa - Diagnóstico do BVDV/MD bovino em pools de leite: <ul style="list-style-type: none">• Amostras com uma relação A/N superior ou equivalente a 80 % são consideradas considerados de rebanhos com prevalência de BVD/MD inferior a 10%.• Amostras com uma relação A/N superior a 45 % e inferior a 80 % são consideradas de rebanhos com prevalência de BVD/MD entre 10% e 30%.• Amostras com uma relação A/N inferior ou equivalente a 45 % são consideradas de rebanhos com prevalência de BVD/MD superior a 30%.

*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.

PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.

Representante exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor

ABASE COMÉRCIO E REPRESENTAÇÕES LTDA.

Av. Emílio Marconato, 1000 - Galpão B3

Jaguariúna – SP - CEP: 13820-000

Fone/Fax: (19) 3847-9900

CNPJ: 63.982.896/0001-71

Responsável técnico: Edison Hideyo Baba

CRMV-SP 2967

Proprietário:

IDEXX Laboratories, Inc.

One Idexx Drive, Westbrook, Maine

04092-EUA

Para assistência técnica:

Contacte o representante local IDEXX

ou visite: www.idexx.com/production/contact/

IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

Fabricante:

IDEXX Montpellier SAS

326 rue de la Galéra

Parc Euromédecine

34090 Montpellier

France

Kit para la detección de Anticuerpos frente a la proteína p80 del BVDV/MD/BDV

Para uso veterinario exclusivo

Nombre y uso propuesto

IDEXX BVDV p80 Ab es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de anticuerpos frente a la proteína p80 para el diagnóstico del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV) y de la Enfermedad de las Mucosas (MD) en muestras individuales de suero, plasma y leche bovinos y en mezclas de suero (máximo 10) y mezclas de leche bovinos, y para el diagnóstico de la Enfermedad de la Frontera (BD) en muestras individuales de suero y plasma y en mezclas de suero (máximo 5) de ovinos.

Información general

El Virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es un pestivirus, causante de dos enfermedades: Diarrea Viral Bovina (BVD) y Enfermedad de las Mucosas (MD). La BVD es una patología inducida por una de las dos cadenas del virus (cito patogénica y no-cito patogénica). La forma aguda se caracteriza por fiebre y diarrea, es pasajera con gran morbilidad y baja mortalidad. Los animales adultos pueden también infectarse de forma subclínica asintomática. La enfermedad de las Mucosas tiene un bajo porcentaje de morbilidad (1%), pero una gran mortalidad. Se caracteriza principalmente por úlceras en diferentes niveles del tracto digestivo y diarreas hemorrágicas. Muchas patologías pueden venir asociadas o ser agravadas por el BVDV, como enfermedades respiratorias, bajo desarrollo, defectos congénitos, etc. La Enfermedad de las Mucosas se da en terneros infectados durante la gestación (Animales Immunotolerantes Persistentemente Infectados) (I.P.I.). Estos animales fueron infectados por una cepa no citopatogénica vía transplacentaria entre el 2º y 4º mes de gestación. Esto corresponde a un periodo donde la inmunidad está desarrollándose en el feto: los antígenos extraños presentes son considerados como propios y no se desarrolla una respuesta inmune contra ellos. Los animales persistentemente infectados no producen anticuerpos frente a las cepas por las que fueron infectados. La Enfermedad de las Mucosas es inducida por una mutación de una cepa no citopatogénica a una cepa citopatogénica. La principal fuente de infección son los animales I.P.I., los cuales continuamente producen y eliminan virus, y de forma transitoria (10 días) animales recientemente infectados con una infección primaria del BVDV. La presencia de BVDV en un rebaño puede ser detectada mediante un estudio serológico, el cual revela la presencia de animales con anticuerpos específicos. Sin embargo, no es posible detectar a los animales I.P.I. Este test ELISA puede ser rápidamente implantado, siendo muy fiable y apropiado para el análisis de un gran número de muestras y puede ser usado para el análisis de tanques de leche. Está basado en el principio de competición entre el anticuerpo bovino y una peroxidasa unida a un anticuerpo monoclonal anti-p80 "WB 112".

Este kit está diseñado para la detección de anticuerpos frente a la proteína P80 para el diagnóstico del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV) y de la Enfermedad de las Mucosas (MD) en muestras individuales de suero, plasma y leche bovinos y en mezclas de suero (máximo 10) y leche bovinos, y para el diagnóstico de la Enfermedad de la Frontera (BD) en muestras individuales de suero y plasma y en mezclas de suero (máximo 5) de ovinos.

Descripción y principios

Las placas están tapizadas con la proteína p80 fijada a los pocillos mediante un anticuerpo específico WB103. Las muestras a analizar se diluyen y se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo presente específico frente a la proteína p80 formará un inmuno-complejo antígeno-anticuerpo. Tras el lavado, se incuban en los pocillos un anticuerpo monoclonal anti-proteína p80 unido a un enzima. En presencia del inmuno-complejo antígeno-anticuerpo, el conjugado no podrá unirse con el correspondiente epítipo. Por el contrario, el conjugado se unirá a la proteína p80 si en la muestra no hay anticuerpos específicos frente a la proteína p80.

Después de otro lavado, se añade a los pocillos el enzima sustrato (TMB). En presencia del enzima, el sustrato se convierte en un producto generando una coloración azul, que vira a amarilla cuando se añade la Solución de Frenado. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-proteína p80 presentes en la muestra (consulte las secciones "Cálculos" e "Interpretación de los resultados").

El diagnóstico se obtiene comparando la densidad óptica (DO) de la muestra con la media del Control Negativo (consulte las secciones "Cálculos" e "Interpretación de los resultados").

Reactivos

Conserve todos los reactivos a 2–8°C.

Reactivos		Cantidad
1	Placas tapizadas con proteína p80 del BVDV/MD/BDV	5
2	Control Positivo	2 ml
3	Control Negativo	2 ml
4a	Conjugado Concentrado (anti-p80 HRPO)	0,75 ml
4b	Solución Tampón de Dilución n.º1	120 ml
5	Solución Tampón de Dilución n.º9	120 ml
A	Substrato TMB n.º9	60 ml
B	Solución de Frenado n.º3	60 ml
C	Solución de Lavado Concentrada (20X)	100 ml

NOTA: Ver tabla en la página 45 para las explicaciones de los símbolos internacionales utilizados en las etiquetas del kit.

Materiales necesarios que no se suministran

- Centrífuga (2000 x g)
- Vortex o agitador similar
- Micropipetas de precisión y micropipetas multidispensadoras (los volúmenes de los reactivos descritos en el apartado "Protocolo del ensayo" requieren una pipeta con una precisión inferior o igual al 5%)
- Puntas de micropipetas
- Agitador de microplacas

- Agua destilada o desionizada
- Lavador de microplacas, manual, semiautomática o automática
- Papel de aluminio o adhesivos, para cubrir las microplacas
- Lector de microplacas provisto de filtro de 450 nm

Precauciones y advertencias para los usuarios

- No usar la boca para pipetear.
- Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
- Los controles, el Sustrato TMB y la Solución de Lavado Concentrada (20x) pueden provocar irritación de los ojos.
- La Solución de Frenado puede provocar quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
- Todo el material usado deberá descontaminarse adecuadamente antes de su eliminación. Eliminar el contenido en conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.

Preparación de los reactivos

Solución de Lavado

La Solución de Lavado Concentrada (20X) debe de diluirse 1/20 con agua destilada antes de ser usada (por ej. 15 ml de Solución de Lavado Concentrada (20X) en 285 ml de agua destilada). Esta solución se conoce como "Solución de Lavado".

Nota: La Solución de Lavado Concentrada (20X) debe alcanzar 18–26°C antes de ser utilizada y debe agitarse suavemente para asegurar la disolución de cualquier sal precipitada.

Después de diluir, la Solución de Lavado puede guardarse 3 días a 2–8°C.

Conjugado

Diluir el Conjugado concentrado 1/100 con la Solución Tampón de Dilución n.º1.

Nota: El Conjugado diluido puede guardarse 8 horas a 18–26°C.

Muestras de leche

Pueden utilizarse tanto leche desnatada como leche entera.

Protocolo del ensayo

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

Los controles pueden ser dispensados en cualquier lugar de la microplaca.

Tomar las microplacas tapizadas y marcar la posición de las muestras en una hoja de trabajo.

1. Dispensar la Solución Tampón de Dilución n.º9, los Controles y las muestras:
 - a) Muestras Individuales de Suero y Plasma de Bovino: incubación corta [1 hora (± 5 min.) a 18–26°C]
 - Dispensar 50 µl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo.
 - Dispensar 50 µl de Control Negativo en dos pocillos.
 - Dispensar 50 µl de Control Positivo en un pocillo.
 - Dispensar 50 µl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 1 hora (± 5 min.) a 18–26°C.

- b) Muestras Individuales de Suero y Plasma de Bovino: incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)
- Dispensar 90 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo.
 - Dispensar 10 μl de Control Negativo en dos pocillos.
 - Dispensar 10 μl de Control Positivo en un pocillo.
 - Dispensar 10 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 16–24 horas a 2–8°C.
- c) Mezclas de Sueros de Bovinos (máximo 10): incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)
- Dispensar 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo
 - Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos.
 - Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo.
 - Dispensar 50 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 16–24 horas a 2–8°C.
- Nota: los análisis de mezclas de sueros no son aplicables en Alemania.
- d) Muestras Individuales y Mezclas de Leche de Bovinos: incubación corta [2 horas (\pm 5 min) a 18–26°C]
- Dispensar 50 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en tres pocillos.
 - Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos (que contengan 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9).
 - Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo (que contenga 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9) .
 - Dispensar 100 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 2 horas (\pm 5 min) a 18–26°C.
- Nota: los análisis de mezclas de leche no son aplicables en Alemania.
- e) Muestras Individuales y Mezclas de Leche de Bovinos : incubación larga (16–24 horas a 18–26°C)
- Dispensar 100 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo.
 - Dispensar 100 μl de Control Negativo en dos pocillos.
 - Dispensar 100 μl de Control Positivo en uno pocillo.
 - Dispensar 100 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 16–24 horas a 18–26°C.
- Nota: los análisis de mezclas de leche no son aplicables en Alemania.
- f) Muestras Individuales de Sueros y Plasmas y Mezclas de Sueros de Ovinos (máximo 5): incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)
- Dispensar 50 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en tres pocillos.
 - Dispensar 75 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en pocillos restantes.
 - Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos (que contengan 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9).
 - Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo (que contenga 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9).
 - Dispensar 25 μl de cada muestra a analizar por pocillo (que contenga 75 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9).
 - Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc...) e incubar 16–24 horas a 2–8°C.
- Nota: los análisis de mezclas de sueros no son aplicables en Alemania.

- 2. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μl de Solución de Lavado 3 a 5 veces. Aspirar los contenidos líquidos de todos los pocillos después cada lavado. Tras la aspiración final, eliminar el líquido de lavado residual de cada microplaca golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evitar que las microplacas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
 Nota: si se usa leche desnatada (o la leche tomada bajo la capa de nata), este tipo de lavado es suficiente. Con leche entera se recomienda modificar este método de lavado añadiendo un minuto de inmersión en cada ciclo de lavado. Esto facilita la eliminación de las partículas de grasa que son proclives a fijar el conjugado de manera inespecífica en el paso siguiente. Un lavado cuidadoso es esencial para la obtención de óptimos resultados.
- 3. Dispensar 100 μl de Conjugado diluido en cada pocillo.
- 4. Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc. ...) e incubar 30 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C.
- 5. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μl de Solución de Lavado 3 veces. Aspirar los contenidos líquidos de todos los pocillos después cada lavado. Tras la aspiración final, eliminar el líquido de lavado residual de cada microplaca golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evitar que las microplacas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
- 6. Dispensar 100 μl de Substrato TMB n.º9 en cada pocillo.
- 7. Incubar 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C protegida de la luz.
- 8. Dispensar 100 μl de Solución de Frenado n.º3 por pocillo. Agitar suavemente para homogeneizar el contenido de los pocillos. Secar la base de la microplaca.
- 9. Calibrar el lector en blanco con aire.
- 10. Leer las densidades ópticas a 450 nm (OD.450).
- 11. Calcular los resultados.

Notas: Cuando se utilizan robots, la incubación de microplacas en las incubadoras hace que no sea necesario el uso de cubiertas. Cuide de no golpear ni sacudir la microplaca cuando utilice un robot. Las lecturas pueden hacerse hasta 1 hora después de la distribución de la Solución de Frenado n.º3, si las microplacas son mantenidas en oscuridad.

Criterio de validación

La reacción es considerada válida, si la media del Control Negativo (CN \bar{x}) tiene un valor mínimo medio de OD 450 de 0,800 y si el porcentaje M/N del Control Positivo es inferior a 20 %.

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

Cálculos

Calcular para cada muestra el porcentaje M/N:

Mé dia del Control Negativo

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A_{450} + CN2 A_{450}}{2}$$

Porcentaje M/N de las muestras

$$M/N (\%) = 100 \times \frac{\text{Muestra } A_{450}}{CN\bar{x}}$$

Interpretación de los resultados

Muestras de suero:

Diagnóstico de BVD/MD bovino en muestras individuales de Suero y Plasma y diagnóstico de BD en muestras Individuales de Suero y Plasma y en mezclas de Suero de ovino:

- Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 50 % se consideran Negativas.
- Muestras con porcentaje M/N superior al 40 % e inferior al 50 % se consideran Dudosas y deben de analizarse de nuevo.
- Muestras con un porcentaje M/CN inferior o igual al 40 % deberán considerarse Positivas.

Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en mezclas de Suero:

- Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 60 % se consideran Negativas.
 - Muestras con porcentaje M/N superior al 50 % e inferior al 60 % se consideran Dudosas y deben analizarse de nuevo.
 - Muestras con un porcentaje M/N inferior o igual al 50 % deberán considerarse Positivas.
- Nota: el análisis de mezclas de sueros no es aplicable en Alemania.

Muestras de leche:

Interpretación cualitativa - Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en muestras Individuales y mezclas de Leche:

- Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 80 % se consideran Negativas.
- Muestras con un porcentaje M/N inferior al 80 % deberán considerarse Positivas.

Interpretación semicuantitativa - Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en mezclas de Leche:

- Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 80 % se consideran de un rebaño con una seroprevalencia inferior al 10%.
- Muestras con porcentaje M/N superior al 45 % e inferior al 80 % se consideran de un rebaño con una seroprevalencia entre 10% y 30%.
- Muestras con un porcentaje M/N inferior o igual al 45 % deberán considerarse de un rebaño con una seroprevalencia superior al 30%.

Nota: los análisis de mezclas de leche no son aplicables en Alemania.

☞ = *Modificación en el manual de instrucciones.*

Resumen del Protocolo del ensayo

Se recomienda antes de la realización del test por primera vez, realizar una lectura completa del manual de instrucciones.

Paso	Acción
1. Preparación de los reactivos	<p>La Solución de Lavado Concentrada (20X) debe de diluirse 1/20 con agua destilada antes de ser usada.</p> <p>Diluir el Conjugado concentrado 1/100 con la Solución Tampón de Dilución No. 1.</p>
2. Distribución y incubación de las muestras	<p><u>Muestras Individuales de Suero y Plasma de Bovino : incubación corta [1 hora (\pm 5 min.) a 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo. • Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos. • Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo. • Dispensar 50 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 1 hora (\pm 5 min.) a 18–26°C. <p><u>Muestras Individuales de Suero y Plasma de Bovino: incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 90 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo. • Dispensar 10 μl de Control Negativo en dos pocillos. • Dispensar 10 μl de Control Positivo en un pocillo. • Dispensar 10 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 16–24 horas a 2–8°C. <p><u>Mezclas de Sueros de Bovinos (máximo 10): incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo • Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos. • Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo. • Dispensar 50 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 16–24 horas a 2–8°C. <p><u>Muestras Individuales y Mezclas de Leche de Bovinos: incubación corta [2 horas (\pm 5 min) a 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 50 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en tres pocillos. • Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos (que contengan 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9). • Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo (que contenga 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9) . • Dispensar 100 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 2 horas (\pm 5 min) a 18–26°C. <p><u>Muestras Individuales y Mezclas de Leche de Bovinos: incubación larga (16–24 horas a 18–26°C)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 100 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en cada pocillo. • Dispensar 100 μl de Control Negativo en dos pocillos. • Dispensar 100 μl de Control Positivo en un pocillo. • Dispensar 100 μl de cada muestra a analizar por pocillo (un pocillo por muestra). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 16–24 horas a 18–26°C. <p><u>Muestras Individuales de Sueros y Plasmas y Mezclas de Sueros de Ovinos (máximo 5): incubación larga (16–24 horas a 2–8°C)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dispensar 50 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en tres pocillos. • Dispensar 75 μl de de Solución Tampón de Dilución n.º9 en pocillos restantes. • Dispensar 50 μl de Control Negativo en dos pocillos (que contengan 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9). • Dispensar 50 μl de Control Positivo en un pocillo (que contenga 50 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9). • Dispensar 25 μl de cada muestra a analizar por pocillo (que contenga 75 μl de Solución Tampón de Dilución n.º9). • Homogeneizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas. • Cubrir la microplaca e incubar 16–24 horas a 2–8°C.

3. Lavado de la placa	Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de Solución de Lavado 3 a 5 veces.
4. Distribución del Conjugado	Dispensar 100 μ l de Conjugado diluido en cada pocillo.
5. Incubación del Conjugado	Cubrir la microplaca e incubar 30 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C.
6. Lavado de la placa	Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de Solución de Lavado 3 veces.
7. Distribución del Substrato	Dispensar 100 μ l de Substrato TMB n.º9 en cada pocillo.
8. Incubación del Substrato	Incubar 20 minutos (\pm 3 min.) a 18–26°C protegida de la luz.
9. Frenado de la reacción	Dispensar 100 μ l de Solución de Frenado n.º3 por pocillo.
10. Medición de la placa	Calibrar el lector en blanco con aire. Leer las densidades ópticas a 450 nm (OD.450). Calcular los resultados.
11. Interpretación (M/N %)	<p>Muestras de suero:</p> <p>Diagnóstico de BVD/MD bovino en muestras individuales de Suero y Plasma y diagnóstico de BD en muestras Individuales de Suero y Plasma y en mezclas de Suero de ovino:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 50 % se consideran Negativas. • Muestras con porcentaje M/N superior al 40 % e inferior al 50 % se consideran Dudosas y deben de analizarse de nuevo. • Muestras con un porcentaje M/CN inferior o igual al 40 % deberán considerarse Positivas. <p>Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en mezclas de Suero:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 60 % se consideran Negativas. • Muestras con porcentaje M/N superior al 50 % e inferior al 60 % se consideran Dudosas y deben analizarse de nuevo. • Muestras con un porcentaje M/N inferior o igual al 50 % deberán considerarse Positivas. <p>Muestras de leche:</p> <p>Interpretación cualitativa - Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en muestras Individuales y mezclas de Leche:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 80 % se consideran Negativas. • Muestras con un porcentaje M/N inferior al 80 % deberán considerarse Positivas. <p>Interpretación semicuantitativa - Diagnóstico de BVD/MD para bovinos en mezclas de Leche:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras con porcentaje M/N superior o igual al 80 % se consideran de un rebaño con una seroprevalencia inferior al 10%. • Muestras con porcentaje M/N superior al 45 % e inferior al 80 % se consideran de un rebaño con una seroprevalencia entre 10% y 30%. • Muestras con un porcentaje M/N inferior o igual al 45 % deberán considerarse de un rebaño con una seroprevalencia superior al 30%.

N.º de registro: 0778-RD

Fabricado por:

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra – Parc Euromédecine
34090 Montpellier, France

Para asistencia técnica:

contacte el representante local IDEXX
o visite: www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

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

Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das p80-Protein des BVDV/MD/BDV

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

Name und Verwendungszweck

IDEXX BVDV p80 Ab ist ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Bovinen Virus Diarrhoe/Mucosal Disease (BVDV/MD) in Serum- und Plasma-Einzelproben und Milch- (Einzel- und Tankmilch)-Proben von Rindern bzw. Serum- und Plasma-Einzelproben von Schafen sowie zum Nachweis des Border Disease Virus (BDV) in Serum- und Plasma-Einzelproben von Schafen.

Allgemeine Informationen

Bei dem BVD-Virus (BVDV) handelt es sich um ein Pestivirus, das für zwei Krankheiten verantwortlich ist: Die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) und die Mucosal Disease des Rindes (MD - Mucosal Disease). Die Bovine Virusdiarrhoe wird durch die Infektion mit einem der beiden Biotypen des Virus (cytopathogener Typ oder nicht cytopathogener Typ) hervorgerufen. Die akute Form ist vorübergehender Art und durch eine fiebrige Phase mit gleichzeitigem Auftreten von Diarrhöen gekennzeichnet; sie geht mit erhöhter Morbidität und geringer Mortalität einher. Bei erwachsenen Tieren kann die Erkrankung auch subklinisch und frei von Symptomen verlaufen. Die Mucosal Disease des Rindes geht mit einer geringen Morbidität (1%), aber erhöhter Mortalität einher. Sie ist häufig durch serös-mukösen Ausfluss, Ulzerationen an verschiedenen Stellen des Gastrointestinaltraktes und oft blutigen Diarrhöen gekennzeichnet. Zahlreiche Erkrankungen treten als Begleiterkrankung einer BVDV-Infektion auf oder werden dadurch verschlimmert. Es handelt sich dabei u.a. um Atemwegserkrankungen, Wachstumsstörungen und angeborene Missbildungen. Die Mucosal Disease tritt bei Rindern auf, die als immuntolerante, persistent infizierte (IPI) Rinder geboren wurden. Diese Form der Erkrankung entsteht, wenn der Fötus transplazentar vom 42.-120. Tag der Trächtigkeit mit einem nicht-zytopathogenen BVDV-Stamm in Kontakt kommt. Der in dieser Phase noch immuninkompetente Fötus toleriert das Antigen als körpereigen. Die IPI Rinder produzieren also keine Antikörper gegen den Virusstamm, den sie beherbergen. Diese Tiere erkranken an der Mucosal Disease, wenn der beherbergte, nicht-zytopathogene Virusstamm durch Mutation zu einem zytopathogenen Stamm wird. Die wesentlichen Infektionsquellen sind die IPI-Rinder, die ständige Träger und Ausscheider des Virus sind, sowie vorübergehend (für eine Dauer von 10 Tagen) die kürzlich mit dem BVDV primärinfizierten Tiere. Die Virusübertragung kann oronasal, conjunctival, genital oder transplazentar erfolgen. Die Serodiagnostik ermöglicht den Nachweis des BVDV in einer Herde durch Identifizierung der Tiere, die Träger spezifischer Antikörper sind. Auf diese Weise können allerdings keine IPI-Rinder ermittelt werden. Diese früher mit Methoden der Seroneutralisation durchgeführte Serodiagnostik erfolgt heute mittels ELISA. Es handelt sich dabei um eine schnell durchführbare und zuverlässige Methode, die sich besonders zur Untersuchung einer großen Anzahl von Proben eignet. Die zugrundeliegende Technik beruht auf einem Prinzip der Konkurrenz zwischen den Antikörpern in der zu testenden Probe und einem mit der Meerettich-Peroxidase markierten monoklonalen Anti-p80-Antikörper (WB112).

Dieses Kit ist zum Nachweis von Antikörpern gegen das Protein p80 der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV), der Mucosal Disease des Rindes (MD) in Serum-, Plasma- und Milch-(Einzel- und Tankmilch)-Proben von Rindern und zum Nachweis von Antikörpern gegen das Protein p80 des Border Disease Virus (BD) in Einzel- Serum- und Plasmaproben von Schafen bestimmt.

Beschreibung des Testprinzips

Das p80-Protein ist mittels eines spezifischen Antikörpers (WB103) am Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatten fixiert. Die zu untersuchenden Proben werden verdünnt und zur Inkubation in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Liegen p80 Protein-spezifische Antikörper in den zu testenden Proben vor, werden die Antikörper als p80 Protein-Antikörper-Immunkomplexe am Boden der Mikrotiterplatten gebunden. Nach dem Waschen wird ein Enzym-gekoppelter anti-p80 Protein-Antikörper (Konjugat) hinzugefügt. Bei Anwesenheit des p80 Protein-Antikörper-Immunkomplexes, kann das Konjugat nicht an die entsprechenden Epitope binden. Bei Abwesenheit des p80 Protein-Antikörper-Immunkomplexes, kann das Konjugat an die entsprechenden Epitope binden. Nach dem Waschen wird das Enzymsubstrat (TMB) zugesetzt. Bei Anwesenheit des Enzyms wird das Substrat oxidiert und in einen blauen Farbstoff umgewandelt, der nach dem Stoppen der Reaktion nach gelb umschlägt. Die Intensität der Farbreaktion ist umgekehrt proportional zu der anti-p80 Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben (siehe "Berechnungen" und "Interpretation" der Ergebnisse).

Über die diagnostische Bewertung entscheidet der Vergleich zwischen Proben und Kontrollen (siehe "Berechnungen" und "Interpretation der Ergebnisse").

Reagenzien

Alle Reagenzien bei 2–8°C lagern.

Reagenzien	Menge	
1	Mit BVDV/MD/BDV-p80-Protein beschichtete Testplatten (inaktiviert)	5
2	Positive Kontrolle	2 ml
3	Negative Kontrolle	2 ml
4a	Konjugatkonzentrat (Anti-p80 HRPO)	0,75 ml
4b	Verdünnungspuffer Nr.1	120 ml
5	Verdünnungspuffer Nr.9	120 ml
A	TMB-Substrat Nr.9	60 ml
B	Stopplösung Nr.3	60 ml
C	Waschkonzentrat (20X)	100 ml

Hinweis: Tabelle auf Seite 45 mit der Beschreibung der auf den Testkit-Etiketten gebrauchten Symbole beachten.

Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

- Zentrifuge 2000 x g
- Vortex-Mischer
- Präzisionspipetten und Multikanalmikropipetten (die erforderliche Messgenauigkeit muss für sämtliche angegebenen Mengen weniger oder gleich 5% betragen)
- Waschsystem für die Mikrotiterplatten zur Verteilung von jeweils 300 µl pro Vertiefung
- Einweg-Pipettenspitzen
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
- Manuelles, halbautomatisches oder automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Abdeckungen für Mikrotiterplatten (Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie)
- Photometer mit 450 nm Filter für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Die Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- Kontrollen, TMB-Substrat und Waschkonzentrat (20X) können Augenreizungen verursachen.
- Stopplösung verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- Das Testmaterial ist nach Abschluss des Tests als infektiös zu betrachten und darf nur inaktiviert entsorgt werden.
- Infektiöse Materialien nach den regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung

Das Waschkonzentrat (20X) vor Gebrauch 1:20 mit destilliertem/demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B.: 15 ml Waschkonzentrat (20X) mit 285 ml destilliertem Wasser verdünnen).

Diese Lösung wird in der Folge "Waschlösung" genannt.

Anmerkung: Das Waschkonzentrat (20X) sollte vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden und durch leichtes Schütteln gemischt werden, um ausgefällte Salze aufzulösen. Die Waschlösung ist nach der Verdünnung 3 Tage bei 2–8°C haltbar.

Konjugat

Das Konjugatkonzentrat 1:100 mit Verdünnungspuffer Nr.1 verdünnen.

Anmerkung: Diese Lösung ist nach der Verdünnung 8 Stunden bei 18–26°C haltbar.

Milchproben

Für die Milchproben kann entrahmte Milch oder Vollmilch verwendet werden.

Testanweisung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf 18–26°C gebracht werden. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen. Die beschichteten Mikrotiterplatten hernehmen und die Position der Proben auf einem Arbeitsblatt notieren.

1. Verdünnungspuffer Nr.9, Kontrollen und Proben:

- a) Einzel-Serum- und Plasmaproben von Rindern: Kurzinkubation [1 Stunde (\pm 5 Min.) bei 18–26°C]
 - 50 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben.
 - 50 μ l Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
 - 50 μ l Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - 50 μ l von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
 - Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 1 Stunde (\pm 5 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

- b) Einzel-Serum- und Plasmaproben von Rindern: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 2–8°C]
 - 90 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben.
 - 10 μ l Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
 - 10 μ l Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - 10 μ l von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
 - Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 2–8°C inkubieren.

- c) Einzel- und Tankmilchproben von Rindern: Kurzinkubation [2 Stunden (\pm 5 Min.) bei 18–26°C]
 - 50 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 in drei Vertiefungen geben.
 - 50 μ l Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen (wo sich bereits 50 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben.
 - 50 μ l Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 50 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben.
 - 100 μ l von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
 - Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 2 Stunden (\pm 5 Min.) bei 18–26°C inkubieren.

- d) Einzel- und Tankmilchproben von Rindern: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 18–26°C]
 - 100 μ l Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben.
 - 100 μ l Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben.
 - 100 μ l Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - 100 μ l von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben.
 - Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
 - Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 18–26°C inkubieren.

e) Einzel-Serum- und Plasmaproben von Schafen: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 2–8°C]

- 50 μl Verdünnungspuffer Nr.9 in drei Vertiefungen geben.
- 75 μl Verdünnungspuffer Nr.9 in übrigen Vertiefungen geben.
- 50 μl Negative Kontrolle in zwei entsprechenden Vertiefungen (wo sich bereits 50 μl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben.
- 50 μl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 50 μl Verdünnungspuffer 9 befinden) geben.
- 25 μl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 75 μl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben.
- Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen.
- Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 2–8°C inkubieren.

2. Jede Vertiefung dreimal bis fünfmal mit ca 300 μl Waschlösung waschen und den flüssigen Inhalt aus jeder Vertiefung nach jedem Waschen entfernen. Nach dem letzten Waschschrift vorsichtig, aber fest die Reste der Waschlösung aus den Vertiefungen auf ein Stück Saugpapier ausklopfen. Ein Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschschriften und vor Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden.

Anmerkung: Wenn mit entfetteter Milch gearbeitet wird (oder wenn die Milch unterhalb der Rahmschicht entnommen wurde), ist die beschriebene Waschprozedur ausreichend. Bei der Verwendung von Vollmilch wird empfohlen die Methodik dahingehend zu ändern pro Waschzyklus die Lösung 1 Minute lang einwirken zu lassen. Dies ermöglicht die Ablösung der Fettpartikel, welche das Konjugat im nächsten Schritt unspezifisch binden könnten. Gründliches Waschen ist essentiell um optimale Ergebnisse zu erzielen.

3. 100 μl verdünntes Konjugat in jede Vertiefung geben.
4. Die Mikrotiterplatte abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 30 Min. (\pm 3 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
5. Jede Vertiefung dreimal mit ca 300 μl Waschlösung waschen und den flüssigen Inhalt aus jeder Vertiefung nach jedem Waschen entfernen. Nach dem letzten Waschschrift vorsichtig, aber fest die Reste der Waschlösung aus den Vertiefungen auf ein Stück Saugpapier ausklopfen. Dabei ein Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschschriften und vor Zugabe des nächsten Reagenz vermeiden.
6. 100 μl TMB-Substrat Nr.9 in jede Vertiefung geben.
7. Die Mikrotiterplatte 20 Minuten (\pm 3 Min.) bei 18–26°C im Dunkeln inkubieren.
8. 100 μl Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung geben. Die Mikrotiterplatte leicht schütteln, um zu homogenisieren. Die Unterseite der Mikrotiterplatten sorgfältig abwischen.
9. Das Photometer mit Luft als Leerwert kalibrieren.
10. Die optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm messen und Werte notieren.
11. Ergebnisse berechnen.

Anmerkung: Bei Verwendung von Robotern zur ELISA-Abarbeitung ist eine Inkubation mit Mikrotiterplattenabdeckung nicht nötig. Das Schütteln und Ausklopfen der Mikrotiterplatte ist bei der Abarbeitung mittels Roboter nicht möglich. Die Messung kann bis zu 1 Stunde nach Zugabe der Stopplösung Nr.3 erfolgen, wenn die Mikrotiterplatte bis dahin im Dunkeln aufbewahrt wird.

Ergebnisse

Damit der Test gültig ist, muss der Mittelwert der negativen Kontrolle ($NK\bar{X}$) mindestens 0,800 betragen. Zusätzlich sollte P/NK % der positiven Kontrolle kleiner als 20 % sein.

Hinweis: IDEXX hält für Sie Geräte und Softwaresysteme zur Berechnung des P/NK-Verhältnisses und zur Datenverarbeitung bereit.

Berechnungen

Für jede Probe P/NK % berechnen:

Mittelwert der negativen Kontrolle

$$NK\bar{x} = \frac{NK1 A450 + NK2 A450}{2}$$

Berechnung der P/NK % für jede Probe

$$P/NK (\%) = 100 \times \frac{\text{Probe } A_{450}}{NK\bar{x}}$$

Interpretation der Ergebnisse

Einzel-Serum- und Plasmaproben (Nachweis von BVDV/MD in Rindern, Nachweis von BDV in Schafen):

- Proben mit P/NK % größer oder gleich 50 % gelten als negativ.
- Proben mit P/NK % größer als 40 % und kleiner als 50 % gelten als fraglich und müssen erneut analysiert werden.
- Proben mit P/NK % kleiner oder gleich 40 % gelten als positiv.

Einzel- und Tankmilchproben (Nachweis von BVDV/MD in Rindern):

- Proben mit P/NK % größer oder gleich 80 % gelten als negativ.
- Proben mit P/NK % kleiner als 80 % gelten als positiv.

👁 = Veränderung der Gebrauchsinformation

Kurzbeschreibung

Es ist empfehlenswert, vor dem ersten Gebrauch des Testkits die gesamte Anleitung durchzulesen.

Schritt	Handlung
1. Vorbereitung der Reagenzien	<p>Das Waschkonzentrat (20X) vor Gebrauch 1:20 mit destilliertem/demineralisiertem Wasser verdünnen.</p> <p>Das Konjugatkonzentrat 1:100 mit Verdünnungspuffer Nr. 1 verdünnen.</p>
2. Probenverteilung und -inkubation	<p><u>Einzel-Serum- und Plasmaproben von Rindern: Kurzinkubation [1 Stunde (± 5 Min.) bei 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben. • 50 µl Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben. • 50 µl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben. • 50 µl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben. • Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen. • Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 1 Stunde (± 5 Min.) bei 18–26°C inkubieren. <p><u>Einzel- Serum- und Plasmaproben von Rindern: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 90 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben. • 10 µl Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben. • 10 µl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben. • 10 µl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben. • Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen. • Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 2–8°C inkubieren. <p><u>Einzel- und Tankmilchproben von Rindern: Kurzinkubation [2 Stunden (± 5 Min.) bei 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in drei Vertiefungen geben • 50 µl Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen (wo sich bereits 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben. • 50 µl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben. • 100 µl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben. • Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen. • Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 2 Stunden (± 5 Min.) bei 18–26°C inkubieren <p><u>Einzel- und Tankmilchproben von Rindern: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 18–26°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 100 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in jede Vertiefung geben. • 100 µl Negative Kontrolle in zwei entsprechende Vertiefungen geben. • 100 µl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung geben. • 100 µl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung geben. • Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen. • Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 18–26°C inkubieren <p><u>Einzel- Serum- und Plasmaproben von Schafen: Übernacht Inkubation [16–24 Stunden bei 2–8°C]</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in drei Vertiefungen geben. • 75 µl Verdünnungspuffer Nr.9 in übrigen Vertiefungen geben. • 50 µl Negative Kontrolle in zwei entsprechenden Vertiefungen (wo sich bereits 50 µl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben. • 50 µl Positive Kontrolle in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 50 µl Verdünnungspuffer 9 befinden) geben. • 25 µl von jeder Probe in eine entsprechende Vertiefung (wo sich bereits 75 µl Verdünnungspuffer Nr.9 befinden) geben. • Den Inhalt der Vertiefungen mit Mikrotiterplatten-Schüttler mischen. • Die Mikrotiterplatten abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 16–24 Stunden bei 2–8°C inkubieren

3. Waschen der Platte	Jede Vertiefung dreimal bis fünfmal mit ca 300 μ l Waschlösung waschen.
4. Konjugatverteilung	100 μ l verdünntes Konjugat in jede Vertiefung geben.
5. Konjugatinkubation	Die Mikrotiterplatte abgedeckt (mit Deckel, Alu-Folie oder Klebefolie) für 30 Min. (\pm 3 Min.) bei 18–26°C inkubieren.
6. Waschen der Platte	Jede Vertiefung dreimal mit ca 300 μ l Waschlösung waschen.
7. Substratverteilung	100 μ l TMB-Substrat Nr.9 in jede Vertiefung geben.
8. Substratinkubation	Die Mikrotiterplatte 20 Min. (\pm 3 Min.) bei 18–26°C im Dunkeln inkubieren.
9. Stoppen der Reaktion	100 μ l Stopplösung Nr.3 in jede Vertiefung geben.
10. Messen der Platte	Das Photometer mit Luft als Leerwert kalibrieren. Die optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm messen und Wert notieren. Ergebnisse berechnen.
11. Interpretation (P/NK %)	<p>Einzel-Serum- und Plasmaproben (Nachweis von BVDV/MD in Rindern, Nachweis von BDV in Schafen)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proben mit P/NK % größer oder gleich 50 % gelten als negativ. • Proben mit P/NK % größer als 40 % und kleiner als 50 % gelten als fraglich und müssen erneut analysiert werden. • Proben mit P/NK % kleiner oder gleich 40 % gelten als positiv. <p>Einzel- und Tankmilchproben (Nachweis von BVDV/MD in Rindern)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proben mit P/NK % größer oder gleich 80 % gelten als negativ. • Proben mit P/NK % kleiner als 80 % gelten als positiv.

Zul.–Nr.: BGVV-B 296

Produziert durch:

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra
Parc Euromédecine
34090 Montpellier - France

Für technische Unterstützung:

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter
oder besuchen Sie unsere Webseite:
www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

*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.

**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Symbol-Beschreibungen /
Descrizione dei simboli / Descripciones de los símbolos / Descrições do símbolos**

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



Manufacturer

IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra
34090 Montpellier
France

EU-Representative

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