



## **Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit**

**Trousse de détection d'anticorps contre le virus de la bronchite infectieuse**

**Kit para Detecção de Anticorpos contra o Vírus da Bronquite Infecciosa**

**USO VETERINÁRIO**

**Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Bronquitis Infecciosa**

**Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bronchitis**

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



# Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit

For veterinary use only.

## Name and Intended Use

IDEXX IBV is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection of antibody to infectious bronchitis virus (IBV) in chicken serum.

## General Information

An assessment of immune status as well as serologic identification of IBV requires a measurement of antibody to IBV in serum. Enzyme immunoassay systems have proven efficacious in the quantification of antibody levels to IBV and facilitate the monitoring of immune status in large flocks.

## Descriptions and Principles

This assay is designed to measure the relative level of antibody to IBV in chicken serum. Viral antigen is coated on 96-well plates. Upon incubation of the test sample in the coated well, antibody specific to IBV forms a complex with the coated viral antigens. After washing away unbound material from the wells, a conjugate is added which binds to any attached chicken antibody in the wells. Unbound conjugate is washed away and enzyme substrate is added. Subsequent color development is directly related to the amount of antibody to IBV present in the test sample.

Reagents		Volume
1	IBV Antigen Coated Plate	5
2	Positive Control — diluted chicken anti-IBV serum, preserved with sodium azide	1 x 1.9 mL
3	Negative Control — diluted chicken serum non-reactive to IBV, preserved with sodium azide	1 x 1.9 mL
4	Conjugate — (Goat) anti-chicken: HRPO Conjugate, preserved with gentamicin and Kathon	1 x 50 mL
5	Sample Diluent — preserved with sodium azide	1 x 235 mL
A	TMB Substrate	1 x 60 mL
B	Stop Solution	1 x 60 mL

**NOTE:** See table at the end of the insert for a description of international symbols used on the labels of this kit.

## Materials Required but Not Provided

Precision pipettes and multiple delivery pipetting device with disposable pipette tips, 96-well plate reader, tubes for diluting samples, distilled or deionized water and device for the delivery and aspiration of wash solution. Reagent volumes listed in the Test Procedure require pipette precision less than or equal to 5%.

## Precautions and Warnings for Users

Handle all IBV biological materials as though capable of transmitting IBV. The antigen coated plates may be a source of IBV. Prior to coating on the solid phase, the antigen has been inactivated by chemical treatment. Nevertheless, do not assume complete inactivation. Some kit components contain sodium azide as a preservative. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations. Do not expose TMB solutions to strong light or any oxidation agents. Store all reagents at 2–8°C. All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Do not use kit serials past expiration date and do not intermix components from kits with different serial numbers. Careful pipetting and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. For veterinary use only.

## Preparation of Samples

Dilute test samples five hundred fold (1:500) with sample diluent prior to being assayed (e.g., by diluting 1  $\mu$ L of sample with 500  $\mu$ L of Sample Diluent). **NOTE: DO NOT DILUTE CONTROLS. Be sure to change tips for each sample. Samples must be thoroughly mixed prior to dispensing into the coated plate.**

## Test Procedure

Allow the reagents to come to 18–26°C then mix gently by inverting and swirling.

1. Obtain antigen-coated plate(s) and record the sample position.
2. Dispense 100  $\mu$ L of UNDILUTED Negative Control into duplicate wells.
3. Dispense 100  $\mu$ L of UNDILUTED Positive Control into duplicate wells.
4. Dispense 100  $\mu$ L of diluted sample into appropriate wells. Samples may be tested in duplicate but a single well is acceptable.
5. Incubate for 30 minutes ( $\pm$  2 minutes) at 18–26°C.
6. Aspirate liquid content of all wells into appropriate waste reservoir.
7. Wash each well with approximately 350  $\mu$ L of distilled or deionized water 3–5 times. Aspirate completely.
8. Dispense 100  $\mu$ L of Conjugate into each well.
9. Incubate for 30 minutes ( $\pm$  2 minutes) at 18–26°C.
10. Repeat steps 6 and 7.
11. Dispense 100  $\mu$ L of TMB Substrate into each well.
12. Incubate for 15 minutes ( $\pm$  1 minute) at 18–26°C.
13. Dispense 100  $\mu$ L of Stop Solution into each well to stop the reaction.
14. Measure and record absorbance values at 650nm, A(650).

## Results

For the assay to be valid, the difference between the Positive Control mean and the Negative Control mean ( $PC\bar{x} - NC\bar{x}$ ) should be greater than 0.075. The Negative Control mean absorbance should be less than or equal to 0.150. The presence or absence of antibody to IBV is determined by relating the A(650) value of the unknown to the Positive Control mean. The Positive Control is standardized and represents significant antibody levels to IBV in chicken serum. The relative level of antibody in the sample is determined by calculating the sample to positive (S/P) ratio. Endpoint titers are calculated using the equation described in the calculations section.

## Calculations

1	Negative Control mean ( $NC\bar{x}$ )	$\frac{NC1 A(650) + NC2 A(650)}{2} = NC\bar{x}$
2	Positive Control mean ( $PC\bar{x}$ )	$\frac{PC1 A(650) + PC2 A(650)}{2} = PC\bar{x}$
3	S/P Ratio	$\frac{\text{Sample Mean} - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}} = S/P$
4	Titer - Relates S/P at a 1:500 dilution to an endpoint titer:	$\text{Log}_{10}\text{Titer} = 1.09 (\log_{10} S/P) + 3.36$

## Interpretation of Results

Serum samples with S/P ratios of less than or equal to 0.20 should be considered negative. S/P ratios greater than 0.20 (titers greater than 396) should be considered positive and indicate vaccination or other exposure to IBV. Each laboratory should establish its own criterion for immunity with respect to antibody titer based on correlation of IDEXX IBV to current laboratory test methodologies and on historical antibody responses to specific vaccines and vaccination protocols. The immune status of a flock is best assessed by monitoring and recording antibody titers in representative samples as a function of time. The resulting flock profiles allow an assessment of the distribution of antibody titers and an analysis of changes in titer over time.

## **IDEXX Technical Services**

IDEXX USA Tel: 1 800 548 9997 or 1 207 556 4890

Fax: 1 800 328 5461 or 1 207 556 4826

IDEXX Europe Tel: 00800 727 43399

Fax: 00800 433 99329

U.S. Vet. License No. 313

Product Code: 5030.00

\*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

©2012 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

## Trousse de détection d'anticorps contre le virus de la bronchite infectieuse

Réservé à l'usage vétérinaire.

### Définition et application

IDEXX IBV est une trousse de dosage immunoenzymatique mise au point par IDEXX pour la détection d'anticorps contre le virus de la bronchite infectieuse (IBV) à partir du sérum de poulet.

### Généralités

Le dosage d'anticorps anti-IBV présents dans le sérum de l'animal permet d'évaluer le statut immunitaire de ce dernier au regard du IBV. Le dosage immunoenzymatique s'est avéré être une méthode efficace pour évaluer le niveau d'anticorps produits par l'organisme contre la maladie et vérifier l'état immunitaire des grands troupeaux.

### Description et principe

Le dosage a pour but de mesurer le niveau relatif d'anticorps anti-IBV présents dans le sérum des poulets. Chaque plaque est constituée de 96 cupules sensibilisées avec des antigènes du IBV. Durant l'incubation, les anticorps spécifiques anti-IBV, s'ils sont présents dans l'échantillon à tester, se fixent aux antigènes couplés à la microplaque et forment des complexes Ag-Ac. Les fractions non fixées sont ensuite éliminées par lavage et un conjugué anti-poulet marqué à la peroxydase se lie aux anticorps précédemment fixés. Les fractions non fixées sont éliminées par lavage et la réaction est révélée par oxydation du substrat de l'enzyme correspondante, qui se traduit par une réaction colorée. La coloration obtenue est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-IBV présents dans l'échantillon à tester.

Réactifs		Volume
1	Microplaque sensibilisée avec des antigènes IBV	5
2	Contrôle positif — antisérum de poulet positif anti-IBV dilué, conservateur: azoture de sodium	1 x 1,9 ml
3	Contrôle négatif — sérum de poulet négatif en Ac anti-IBV dilué, conservateur: azoture de sodium	1 x 1,9 ml
4	Conjugué — conjugué anti-poulet (chèvre) marqué à la peroxydase de raifort, conservateurs: gentamicine et Kathon	1 x 50 ml
5	Diluant des échantillons — conservateur: azoture de sodium	1 x 235 ml
A	Substrat TMB	1 x 60 ml
B	Solution d'arrêt	1 x 60 ml

**REMARQUE:** voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles internationaux utilisés sur les étiquettes de la trousse.

## Matériel nécessaire mais non fourni

Pipettes de précision ou pipettes multicanaux avec embouts jetables. Microtubes pour la dilution des échantillons. Eau distillée ou désionisée. Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique. Spectrophotomètre. La précision requise pour la mesure des volumes indiqués au chapitre Description du test doit être inférieure ou égale à 5%.

## Mises en garde et précautions d'emploi

Manipuler toutes les substances biologiques avec précaution comme si elles pouvaient transmettre le IBV. Les plaques sensibilisées doivent être considérées comme source potentielle de IBV. Avant la sensibilisation des plaques, les antigènes ont été inactivés par traitement chimique. Néanmoins, ne pas supposer l'inactivation complète. Certains composants de la trousse sont stabilisés par de l'azote de sodium. Éliminer le contenu conformément aux réglementations locales, régionales et nationales. Ne pas exposer la solution de substrat TMB à une forte lumière ou à des agents oxydants. Conservez tous les réactifs à 2–8°C. Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption et ne pas mélanger les composants avec ceux de trousse ayant un numéro de série différent. Respecter rigoureusement la procédure prescrite pour obtenir des résultats optimaux. Usage vétérinaire uniquement.

## Préparation des échantillons

Diluer les échantillons à tester au 1:500 avec le diluant des échantillons (1  $\mu$ l de sérum + 500  $\mu$ l de diluant). **REMARQUE: NE PAS DILUER LES CONTRÔLES. Changer d'embout de pipette entre chaque échantillon et homogénéiser les échantillons pré-dilués préalablement à leur distribution dans la microplaque sensibilisée.**

## Description du test

Amener les réactifs à 18–26°C puis les homogénéiser par retournement ou agitation douce.

1. Réserver le nombre de plaques nécessaires à la manipulation et noter la position des échantillons.
2. Distribuer 100  $\mu$ l de contrôle négatif NON DILUÉ dans deux cupules.
3. Distribuer 100  $\mu$ l de contrôle positif NON DILUÉ dans deux cupules.
4. Distribuer 100  $\mu$ l de chaque échantillon pré-dilué à tester dans les cupules appropriées. Les échantillons peuvent être testés en double mais un test en simple est acceptable.
5. Incuber pendant 30 minutes ( $\pm$  2 minutes) à 18–26°C.
6. Aspirer le liquide contenu dans la plaque dans un réservoir à déchets approprié.
7. Laver chacune des cupules 3 à 5 fois en utilisant environ 350  $\mu$ l d'eau distillée ou désionisée. Aspirer complètement.
8. Distribuer 100  $\mu$ l de conjugué dans chaque cupule.
9. Incuber pendant 30 minutes ( $\pm$  2 minutes) à 18–26°C.
10. Reprendre les étapes 6 et 7.
11. Distribuer 100  $\mu$ l de substrat TMB dans chaque cupule.
12. Incuber pendant 15 minutes ( $\pm$  1 minute) à 18–26°C.
13. Distribuer 100  $\mu$ l de solution d'arrêt dans chaque cupule.
14. Mesurer les valeurs de densité optique des échantillons et des contrôles à l'aide d'un spectrophotomètre en monochromatisme à 650 nm, A(650).



## Résultats

Le test est validé si la différence entre la valeur moyenne du contrôle positif et la valeur de moyenne du contrôle négatif ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) est supérieure à 0,075. De plus, la valeur moyenne de densité optique du contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,150. La présence ou l'absence d'anticorps anti-IBV est déterminée par la valeur du rapport E/P pour chaque échantillon. Le contrôle positif est calibré et représente un niveau significatif d'anticorps anti-IBV dans le sérum de poulet. Les titres finals sont calculés en utilisant l'équation décrite dans la section "Calculs".

### Calculs

1	Moyenne du contrôle négatif ( $CN\bar{x}$ )	$\frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2} = CN\bar{x}$
2	Moyenne du contrôle positif ( $CP\bar{x}$ )	$\frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2} = CP\bar{x}$
3	Rapport E/P	$\frac{\text{Moyenne de l'échantillon} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}} = E/P$
4	Titre. Établit le rapport entre E/P (dilution 1:500) et un titre final:	$\text{Titre } \log_{10} = 1,09 (\log_{10} E/P) + 3,36$

### Interprétation des résultats

Les échantillons de sérum dont la valeur du rapport E/P est égale ou inférieure à 0,20 doivent être considérés comme négatifs. Lorsque la valeur du rapport E/P est supérieure à 0,20 (titres supérieurs à 396), les échantillons sont positifs et indiquent que le poulet a été vacciné ou exposé au IBV. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères d'immunité concernant le titre des anticorps obtenus avec IDEXX IBV par comparaison avec les méthodes d'analyses en place ainsi qu'avec l'historique des réponses en anticorps aux vaccins et aux protocoles de vaccination. L'état immunitaire d'un troupeau est plus facile à déterminer en surveillant et en consignnant les titres des anticorps en tant qu'échantillons représentatifs de manière chronologique. Les profils de troupeau qui sont obtenus permettent de déterminer la répartition des titres des anticorps et de suivre l'évolution des titres au fil du temps.

**Services techniques d'IDEXX:**

IDEXX USA Tél.: 1 800 548 9997 ou 1 207 556 4890

Télec.: 1 800 328 5461 ou 1 207 556 4826

IDEXX Europe Tél : 00800 727 43399

Télec.: 00800 433 99329

Perm. vét. des É.-U. N° 313

Code de produit: 5030.00

\*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.

© 2012 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

## Kit para Detecção de Anticorpos contra o Vírus da Bronquite Infecciosa

Para uso exclusivamente veterinário.

### Nome e Indicações

IDEXX IBV é um ensaio imunoenzimático da IDEXX para detecção de anticorpos contra o vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) em soro de galinhas.

### Informações Gerais

A avaliação do status imunológico, bem como a identificação sorológica de IBV requerem a medição de anticorpos contra IBV no soro. O ensaio imunoenzimático tem sido eficaz na quantificação do nível de anticorpos contra IBV e facilita o monitoramento do status imunológico em grandes lotes.

### Descrição e Princípios

Este ensaio é designado a medir o nível relativo de anticorpos no soro de galinhas. O antígeno viral é impregnado em placas de 96 cavidades. Quando a amostra teste é incubada na cavidade impregnada, os anticorpos específicos contra IBV, se presentes formam um complexo com o antígeno viral. Após lavar a placa, o conjugado é adicionado e se liga a todos os complexos antígeno-anticorpo formados na placa. O conjugado não aderido é lavado e um substrato enzimático é adicionado. O desenvolvimento subsequente de cor é diretamente relacionado à quantidade de anticorpos contra IBV presentes na amostra teste. Somente para uso veterinário.

### Reagentes

		Volume
1	Placa Impregnada com Antígeno de IBV	5
2	Controle Positivo — soro diluído Anti-IBV de galinha, conservado com azida sódica	1 x 1,9 ml
3	Controle Negativo — Soro de galinha diluído não reativo para IBV, conservado com azida sódica	1 x 1,9 ml
4	Conjugado — conjugado HRPO: Anti-galinha (cabra); conservado com gentamicina e Kathon	1 x 50 ml
5	Diluyente de Amostra — conservado com azida sódica	1 x 235 ml
A	Substrato TMB	1 x 60 ml
B	Solução de Interrupção	1 x 60 ml

**NOTA:** veja a tabela no final do protocolo para descrição dos símbolos internacionais usados nos rótulos dos kits.

## Materiais Necessários, mas Não Fornecidos

Pipetas de precisão e dispositivos de pipetagem múltiplos com ponteiras de pipeta descartáveis, leitora para placas de 96 cavidades, tubos para diluição das amostras, água destilada ou deionizada e dispositivo para a injeção e aspiração da solução de lavagem. Os volumes de reagentes indicados no Procedimento de Teste exigem pipetas com precisão inferior ou igual a 5%.

## Precauções e Advertências aos Usuários

Manusear todos os materiais biológicos de IBV como sendo capazes de transmitir IBV. As placas impregnadas com antígeno podem ser uma fonte de IBV. Antes da impregnação na fase sólida, o antígeno foi inativado por tratamento químico. Todavia, não assuma inatividade completa. Alguns componentes do kit contém azida sódica como conservante. Descartar o conteúdo de acordo com as normas locais, regionais e nacionais. Não expor Soluções TMB à luz forte ou à quaisquer agentes oxidantes. Armazenar todos os reagentes à temperatura de 2–8°C. Todos os resíduos devem ser adequadamente descontaminados antes do descarte. Não usar componentes com prazo de validade vencido e não misturar componentes de kits com número de lote diferente. Pipetagens e lavagens cuidadosas durante todo este procedimento são necessárias para manter a precisão e acurácia. Ótimos resultados serão obtidos seguindo-se rigorosamente este procedimento. Para uso exclusivamente veterinário.

## Preparo das Amostras

Diluir amostra de teste em proporção 1:500 com Diluente de Amostra antes de ser efetuada a análise (por exemplo, diluindo-se 1 µl de amostra com 500 µl de Diluente de Amostra). **NOTA: NÃO DILUIR CONTROLES. Certifique-se de trocar ponteiras para cada amostra. Amostras devem ser totalmente homogeneizadas antes de distribuídas nas placas impregnadas.**

## Procedimento de Teste

Permita que os reagentes atinjam 18–26°C, então mescle gentilmente através de inversão e movimentos circulares leves.

1. Obter placa(s) impregnada(s) de antígeno e registrar a posição da amostra.
2. Distribuir 100 µl de Controle Negativo NÃO DILUÍDO em duplicata.
3. Distribuir 100 µl de Controle Positivo NÃO DILUÍDO em duplicata.
4. Distribuir 100 µl de amostra diluída nas cavidades apropriadas. As amostras devem ser testadas em duplicada, mas uma única cavidade por amostra é aceitável.
5. Incubar por 30 minutos ( $\pm$  2 minutos) à 18–26°C.
6. Aspirar o conteúdo líquido das cavidades e desprezar em reservatório apropriado.
7. Lavar cada cavidade com aproximadamente 350 µl de água destilada ou deionizada por 3 a 5 vezes. Aspire completamente.
8. Distribuir 100 µl de Conjugado em cada cavidade.
9. Incubar por 30 minutos ( $\pm$  2 minutos) à 18–26°C.
10. Repetir os passos 6 e 7.
11. Distribuir 100 µl de Substrato TMB em cada cavidade.
12. Incubar por 15 minutos ( $\pm$  1 minuto) à 18–26°C.
13. Distribuir 100 µl de Solução de Interrupção em cada cavidade para parar a reação.
14. Medir e registrar os valores de absorbância a 650 nm, A(650).

## Resultados

Para o ensaio ser válido, a diferença entre a média do Controle Positivo e a média do Controle Negativo ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) deve ser maior que 0,075. A absorbância média do Controle Negativo deve ser menor ou igual a 0,150. A presença ou ausência de anticorpo contra IBV é determinada relacionando-se o valor A(650) do não conhecido com a média do Controle Positivo. O Controle Positivo é padronizado e representa níveis significativos de anticorpo contra IBV em soro de galinha. O nível de anticorpo da amostra é determinado calculando-se a razão amostra/positivo (A/P). Titulações são calculadas usando-se a equação descrita na seção de cálculos.

### Cálculos

1	Média do Controle Negativo (CN $\bar{x}$ )	$\frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2} = CN\bar{x}$
2	Média do Controle Positivo (CP $\bar{x}$ )	$\frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2} = CP\bar{x}$
3	Coefficiente A/P	$\frac{\text{Média da Amostra} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}} = A/P$
4	Título-Relaciona A/P em uma diluição 1:500 com um título final:	$\text{Log}_{10} \text{Título} = 1,09 \times (\log_{10} A/P) + 3,36$

### Interpretação de Resultados

Amostras de soro com coeficiente A/P menores ou iguais a 0,20, devem ser consideradas negativas. Coeficientes maiores que 0,20 (titulações maiores que 396) devem ser considerados positivo e indicam vacinação ou outra exposição à IBV. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para imunidade com relação à titulação de anticorpo baseado em correlação de IDEXX IBV com metodologias atuais de teste de laboratório e em históricos de respostas de anticorpo para vacinas e protocolos de vacinação específicos. A condição imunológica de um lote é melhor avaliada pelo monitoramento e registro de titulações de anticorpo em amostras representativas ao longo do tempo. Os perfis de lote resultantes permitem uma avaliação da distribuição de títulos de anticorpos e uma análise de mudanças de título ao longo do tempo.

## **Serviços de Assistência Técnica da IDEXX:**

IDEXX EUA Tel: 1 800 548 9997 ou 1 207 556 4890

Fax: 1 800 328 5461 ou 1 207 556 4826

IDEXX Europa Tel: 00800 727 43399

Fax: 00800 433 99329

### **PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.**

REPRESENTANTE, IMPORTADOR E DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO NO BRASIL:

ABASE COMÉRCIO E REPRESENTAÇÕES LTDA.

Av. Emilio 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

Licenciado no Ministério da Agricultura Sob o nº 4.961/1994

\*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.

© 2012 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

PROPRIETÁRIO E FABRICANTE  
IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive, Westbrook,  
Maine 04092, EUA  
Tel.: 207 556 4890 • idexx.com

## Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Bronquitis Infecciosa

Para uso veterinario exclusivo.

### Nombre y uso propuesto

IDEXX IBV es un inmunoanálisis enzimático de IDEXX diseñado para la detección de anticuerpos frente al virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV) en suero de pollo.

### Información general

La evaluación de la condición inmunitaria y la identificación serológica requiere una medición de anticuerpos frente al virus IBV en el suero. Los inmunoanálisis enzimáticos han demostrado ser un método eficaz en la medición cuantitativa de las concentraciones de anticuerpos frente al virus IBV, y facilitan el control de la condición inmunitaria en grupos grandes.

### Descripción y principios

Este análisis está diseñado para medir la concentración relativa de anticuerpos frente al virus IBV en suero de pollo. Placas de 96 pocillos se tapizan con antígeno viral. Después de la incubación de la muestra en el pocillo tapizado, se agrega un anticuerpo específico frente al virus IBV, que forma un complejo con los antígenos virales. Después de eliminar por lavado el material no unido, se añade a los pocillos un conjugado que se une a los anticuerpos de pollo ligados en los pocillos. El conjugado no unido se elimina por lavado, y se agrega a los pocillos un sustrato enzimático. El cambio de color resultante está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpos anti-IBV presentes en la muestra.

Reactivos		Volumen
1	Placa tapizada con Antígeno IBV	5
2	Control positivo — suero de pollo anti-IBV diluido, conservado con azida de sodio	1 x 1,9 ml
3	Control negativo — suero de pollo diluido, no reactivo al IBV, conservado con azida de sodio	1 x 1,9 ml
4	Conjugado — conjugado (de cabra) anti-pollo: peroxidasa de rábano, conservado con gentamicina y Kathon	1 x 50 ml
5	Diluyente de la Muestra — conservado con azida de sodio	1 x 235 ml
A	Substrato TMB	1 x 60 ml
B	Solución de Frenado	1 x 60 ml

**NOTA:** Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos internacionales utilizados en las etiquetas del kit.

## Materiales necesarios que no se suministran

Pipetas de precisión o dispositivos para pipeteado múltiple con puntas de pipeta desechables, lector para placas de 96 pocillos, tubos para diluir las muestras, agua destilada o desionizada y dispositivo para el surtido y la aspiración de la solución de lavado. Los volúmenes de los reactivos listados en el apartado de Procedimiento de la Prueba requieren una pipeta con una precisión inferior o igual al 5%.

## Precauciones y advertencias para los usuarios

Trate todos los materiales biológicos relacionados con IBV como si fueran capaces de transmitir la Bronquitis Infecciosa. Las placas tapizadas con antígeno pueden ser una fuente de IBV. Aunque el antígeno ha sido inactivado mediante un tratamiento químico antes de tapizar la fase sólida, no debe suponerse que la inactivación haya sido completa. Algunos de los componentes del kit contienen azida de sodio como conservante. El desecho de los contenidos debe de hacerse de acuerdo con la regulación local, regional y nacional. No exponga las soluciones TMB a la luz fuerte ni a agentes oxidantes. Almacene todos los reactivos entre 2–8° C. Todos los desechos deben desinfectarse adecuadamente antes de eliminarse. No utilice los kits pasada su fecha de caducidad y no mezcle componentes de kits con número de serie distintos. Se obtendrán resultados óptimos si se sigue este protocolo de manera estricta. Solo para uso veterinario.

## Preparación de las muestras

Diluya las muestras 1:500 con el diluyente de muestras antes de efectuar el análisis (es decir, diluya 1  $\mu$ l de la muestra con 500  $\mu$ l de diluyente). **NOTA: NO DILUYA LOS CONTROLES.**

**Asegúrese de cambiar las puntas de las pipetas cada vez que tome una muestra. Mezcle bien las muestras antes de agregarlas a la placa tapizada con antígeno IBV.**

## Procedimiento de la Prueba

Deje que los reactivos alcancen 18–26°C y luego agítelos suavemente por inversión y con un movimiento circular.

1. Obtenga la placa (o placas) tapizada con antígeno y anote la posición de las muestras.
2. Vierta 100  $\mu$ l de Control Negativo NO DILUIDO en los pocillos por duplicado.
3. Vierta 100  $\mu$ l de Control Positivo NO DILUIDO en los pocillos por duplicado.
4. Vierta 100  $\mu$ l de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Las muestras pueden analizarse por duplicado pero el análisis en un solo pocillo es también aceptable.
5. Incube durante 30 minutos ( $\pm$  2 min.) a 18–26°C.
6. Aspire el contenido líquido de todos los pocillos y viértalo en un recipiente de desperdicios adecuado.
7. Lave cada pocillo de tres a cinco veces con unos 350  $\mu$ l de agua destilada o desionizada. Aspire completamente.
8. Vierta 100  $\mu$ l de conjugado a cada pocillo.
9. Incube durante 30 minutos ( $\pm$  2 min.) a 18–26°C.
10. Repita los pasos 6 y 7.
11. Vierta 100  $\mu$ l de Substrato TMB en cada pocillo.
12. Incube durante 15 minutos ( $\pm$  1 min.) a 18–26°C.
13. Vierta 100  $\mu$ l de la Solución de Frenado en cada pocillo para frenar la reacción.
14. Mida y anote los valores de absorbancia a 650 nm, A(650).



## Resultados

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorbancia media del control positivo y la absorbancia media del control negativo ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) debe ser mayor que 0,075. La absorbancia media del control negativo debe ser menor o igual que 0,150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al virus IBV se determina por medio de una relación entre el valor de A(650) de la muestra con la media del control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos anti-IBV en el suero de pollo. El nivel relativo de anticuerpos en la muestra se determina calculando el coeficiente muestra a positivo (M/P). Los títulos finales se calculan a partir de la ecuación que aparece en la sección de cálculos.

## Cálculos

1	Media del control negativo ( $CN\bar{x}$ )	$\frac{A(650) CN1 + A(650) CN2}{2} = CN\bar{x}$
2	Media del control positivo ( $CP\bar{x}$ )	$\frac{A(650) CP1 + A(650) CP2}{2} = CP\bar{x}$
3	Cociente M/P	$\frac{\text{Media de la muestra} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}} = M/P$
4	Título. Relaciona el cociente M/P en una dilución de 1:500 con un título final:	$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1,09 (\log_{10} M/P) + 3,36$

## Interpretación de los resultados

Las muestras de suero que tengan cocientes M/P inferiores o iguales a 0,20 deben considerarse negativas. Las muestras con cocientes M/P superiores a 0,20 (títulos superiores a 396) deben considerarse positivas e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición al virus IBV. Cada laboratorio debe establecer su propio criterio para inmunidad con respecto al título del anticuerpo, de acuerdo con la correlación del IDEXX Anti-IBV con los métodos de laboratorio actuales, y las respuestas de anticuerpos observadas en el pasado hacia vacunas específicas y protocolos de inmunización. La mejor manera de evaluar el estado inmunitario de un grupo de aves es mediante el control y el seguimiento de los títulos de anticuerpos en muestras representativas en función del tiempo. Los datos resultantes para el grupo permiten evaluar la distribución de los títulos de anticuerpos y analizar los cambios de título en el tiempo.

**Servicio técnico de IDEXX:**

IDEXX EE.UU. Tel: 1 800 548 9997 o 1 207 556 4890

Fax: 1 800 328 5461 o 1 207 556 4826

IDEXX Europa Tel: 00800 727 43399

Fax: 00800 433 99329

No. de registro: 1056-RD

Licencia veterinaria de los EE.UU. Nº 313

Código de producto: 5030.00

\*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.

©2012 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

## Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bronchitis

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

### Name und Verwendungszweck

IDEXX IBV ist ein Enzymimmunoassay von IDEXX zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bronchitis (IBV) in Serumproben von Hühnern.

### Allgemeine Informationen

Untersuchungen des Immunstatus eines Bestandes sowie der serologische Nachweis einer IBV-Infektion erfordern die quantitative Bestimmung von IBV-Antikörpern in Serumproben des Bestandes. Enzymimmunoassays haben sich als effektiv zum Nachweis von Antikörpern gegen das IBV erwiesen und vereinfachen die Kontrolle des Immunstatus großer Bestände.

### Beschreibung des Testprinzips

Das Testsystem dient zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen IBV in Serumproben von Hühnern. Es wurden Mikrotiterplatten mit Virusantigenen beschichtet. Bei der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung bilden spezifische Antikörper gegen das IBV einen Komplex mit dem Virusantigen. Nachdem ungebundenes Material herausgewaschen ist, wird ein Konjugat hinzugefügt, welches sich an alle Antikörper bindet. Im letzten Testschritt wird ungebundenes Konjugat herausgewaschen und ein Enzymsubstrat in die Vertiefungen gegeben. Die darauffolgende Farbentwicklung steht in direkter Korrelation zur Menge von IBV-Antikörpern in der Probe.

Reagenzien	Menge	
1	Mit IBV-Antigen beschichtete Testplatte (inaktiviert)	5
2	Positive Kontrolle — von hyperimmunisierten Hühnern gewonnenes Serum in Puffer mit Proteinstabilisatoren. Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 1,9 ml
3	Negative Kontrolle — von spezifisch pathogenfreien Hühnern gewonnenes Serum in Puffer mit Proteinstabilisatoren. Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 1,9 ml
4	Konjugat — (Ziege) anti-Huhn: HRPO Konjugat, Konservierungsstoff: Gentamicin und Kathon	1 x 50 ml
5	Probenverdünnungspuffer — Konservierungsstoff: Natriumazid	1 x 235 ml
A	TMB-Substrat	1 x 60 ml
B	Stopplösung	1 x 60 ml

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

## Notwendiges Material, das nicht mitgeliefert wird

Präzisionspipetten, Multikanalpipetten, Einwegpipettenspitzen, Photometer zum Lesen von Mikrotiterplatten, Röhrchen für die Verdünnung der Proben, destilliertes oder demineralisiertes Wasser, Vorrichtung zum Aufbringen und Absaugen der Waschlösung. Für die in der Testanweisung aufgeführten Reagenzvolumina sind Pipetten mit einer Genauigkeit von kleiner oder gleich 5% erforderlich.

## Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Obwohl das Antigen vor der Beschichtung chemisch inaktiviert wurde, sollten die damit beschichteten Platten als potentiell infektiös betrachtet werden. Einige Bestandteile des Testkits enthalten Natriumazid zur Konservierung. Abfall entsprechend den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen. Das TMB-Substrat nicht starkem Licht oder oxidierenden Mitteln aussetzen. Alle Reagenzien bei 2–8°C lagern. Alle Abfälle müssen vor der Beseitigung sorgfältig dekontaminiert werden. Die Kit-Bestandteile nicht nach dem Verfalldatum verwenden, und Bestandteile aus Testkits mit verschiedenen Chargennummern nicht untereinander austauschen. Bei strikter Einhaltung dieser Anweisungen werden optimale Ergebnisse erzielt. Sorgfältiges Pipettieren und Waschen während der Testdurchführung sind notwendig, um die Genauigkeit der Werte zu gewährleisten. Nur für den tierärztlichen Gebrauch.

## Vorbereitung der Proben

Die Testproben 1:500 mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnen, bevor sie getestet werden (z.B. 1  $\mu$ l der Probe mit 500  $\mu$ l des Probenverdünnungspuffers). **ACHTUNG: NICHT DIE KONTROLLEN VERDÜNNEN. Die Pipettenspitze muss nach jeder Probe gewechselt werden. Die Proben, bevor sie auf die mit IBV beschichtete Platte aufgetragen werden.**

## Testanweisung

Alle Reagenzien vor der Benutzung auf 18–26°C erwärmen lassen. Die Reagenzien durch leichtes Schütteln mischen.

1. Die mit Antigen beschichtete(n) Platte(n) hernehmen und die Position notieren.
2. 100  $\mu$ l unverdünnte negative Kontrolle in die Doppelvertiefungen geben.
3. 100  $\mu$ l unverdünnte positive Kontrolle in die Doppelvertiefungen geben.
4. 100  $\mu$ l verdünnte Serumprobe in die entsprechenden Vertiefungen geben.  
Die Proben können im Einfachansatz getestet werden, empfehlenswert ist jedoch, sie im Doppelansatz zu testen.
5. 30 Minuten ( $\pm$  2 Minuten) bei 18–26°C inkubieren.
6. Die Flüssigkeit aus allen Vertiefungen in die Auffangvorrichtung absaugen.
7. Jede Vertiefung drei bis fünfmal mit etwa 350  $\mu$ l destilliertem oder demineralisiertem Wasser waschen. Nach dem letzten Waschgang die Flüssigkeit gründlich entfernen.
8. 100  $\mu$ l Konjugat in jede Vertiefung geben.
9. 30 Minuten ( $\pm$  2 Minuten) bei 18–26°C inkubieren.
10. Schritt 6 und 7 wiederholen.
11. 100  $\mu$ l TMB-Substrat in jede Vertiefung geben.
12. 15 Minuten ( $\pm$  1 Minute) bei 18–26°C inkubieren.
13. 100  $\mu$ l Stopplösung in jede Vertiefung geben, um die Reaktion zu stoppen geben.
14. Die Extinktionswerte bei 650 nm, A(650) messen und notieren.

## Ergebnisse

Damit der Test gültig ist, muss die Differenz zwischen dem Mittelwert der positiven Kontrollen und dem Mittelwert der negativen Kontrollen ( $PK\bar{x} - NK\bar{x}$ ) größer als 0,075 sein. Der Mittelwert der negativen Kontrolle sollte kleiner oder gleich 0,150 sein. Das Vorhandensein oder Fehlen von Antikörpern gegen das IBV wird festgestellt, indem man den A(650)-Wert des zu testenden Serums mit der positiven Kontrolle vergleicht. Die positive Kontrolle ist genormt und enthält eine erhebliche Menge von IBV-Antikörpern. Die relative Menge der Antikörper in der zu testenden Serumprobe kann festgestellt werden, indem man das Verhältnis der Probe zur positiven Kontrolle (P/PK) berechnet. Endpunkttiter können von den P/PK-Verhältnissen bei einer Verdünnung von 1:500 berechnet werden, indem die Gleichung benutzt wird, die im Kalkulationsteil angegeben ist.

## Berechnungen

1	Mittelwert der negativen Kontrolle (NK $\bar{x}$ )	$\frac{NK1 A(650) + NK2 A(650)}{2} = NK\bar{x}$
2	Mittelwert der positiven Kontrolle (PK $\bar{x}$ )	$\frac{PK1 A(650) + PK2 A(650)}{2} = PK\bar{x}$
3	P/PK-Verhältnis	$\frac{\text{Mittelwert der Probe} - NK\bar{x}}{PK\bar{x} - NK\bar{x}} = P/PK$
4	Titer: Nachstehende Gleichung verbindet den P/PK-Wert bei einer Verdünnung von 1:500 mit einem Endpunkt-Titer:	$\text{Log}_{10}\text{Titer} = 1,09 (\log_{10} P/PK) + 3,36$

## Interpretation der Ergebnisse

Serumproben mit einem P/PK-Verhältnis kleiner oder gleich 0,20 gelten als negativ. P/PK-Verhältnisse größer als 0,20 (Titer größer als 396) gelten als positiv und indizieren einen Kontakt mit IBV-Impfstoff oder einem IBV-Feldvirus. Jedes Labor sollte seine eigenen Erfahrungswerte für die Interpretation der IDEXX IBV-Ergebnisse sammeln. Dazu sollten die Ergebnisse früher angewandter serologischer Testsysteme mit den IDEXX-Ergebnissen unter Berücksichtigung der angewandten Impfstoffe und Impfprogramme verglichen werden. Der Immunstatus einer Herde wird am sinnvollsten geprüft, indem man die Antikörpertiter an repräsentativen Beispielen regelmäßig überwacht und aufzeichnet. Der daraus resultierende Herdenquerschnitt ermöglicht die Bewertung der Antikörperverteilung und eine Analyse von Titerveränderungen im Laufe der Zeit.

**Technischer Kundendienst:**

IDEXX USA Tel: 1 800 548 9997 oder 1 207 556 4890

Fax: 1 800 328 5461 oder 1 207 556 4826

IDEXX Europa Tel: 00800 727 43399

Fax: 00800 433 99329

Zul.-Nr.: BGAF-B 170

U.S.-Tierarztlizenznummer 313

Produktcode: 5030.00

\*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

© 2012 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

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

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

**IDEXX**

*Manufacturer*

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

*EU-Representative*

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

[idexx.com](http://idexx.com)