

SVANOVIR® BVDV-Ab

Bovine Virus Diarrhoea Virus Antibody Test

Screeningformat

Bovine Virus Diarrhoea Virus

Antikörper Test

Monophasisch

Virus de la Diarrea Viral Bovina prueba para anticuerpos

Formato de monitoreo

Test d'anticorps du Virus de la Diarrhée Bovine Virale

Format de dépistage

Contents	Art. No. 10-2200-50
Microtitre plate Microtitre plates (96 wells) coated with non-infectious BVDV antigen (sealed and stored dry)	10 (Strips) 12 x 8
Conjugate Ready-to-use (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG monoclonal antibodies)	1 x 120 mL
PBS-Tween Solution 20x concentrate	2 x 125 mL
Sample Dilution Buffer Ready-to-use	1 x 120 mL
Substrate Solution (Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H ₂ O ₂) - STORE IN THE DARK!	1 x 100 mL
Stop Solution Contains sulphuric acid (2M) - CORROSIVE!	1 x 50 mL
A. Positive Control Serum - Contains preservatives	1 x 0.7 mL
B. Negative Control Serum - Contains preservatives	1 x 0.7 mL

This manual covers the following
SVANOVIR® BVDV-Ab kit:
Article number 10-2200-50

Bovine Virus Diarrhoea Virus

Antibody Test

Screening format

Name and Application

The SVANOVIR® BVDV-Ab is an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of BVDV specific antibodies in bovine serum, plasma and milk samples; individual samples, pools and bulk tank milk.

General information

The Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV), a pesti-virus, is associated with a range of diseases affecting the alimentary tract of cattle. Clinical signs include pyrexia, diarrhoea and reduced milk yield; there is a high morbidity but low mortality of infected animals¹. Infection of pregnant cows may result in transplacental foetal infection. Foetuses may be aborted, mummified, stillborn or born with severe anomalies. However, in many instances calves, if immunotolerant, are born unaffected but with persistent viraemia and become transmission sources of the virus². Moreover, recurrent infection of such calves may result in mucosal disease³ – a condition with low morbidity but high mortality; it is characterized by extensive erosions in the oral and gastrointestinal mucosa. BVDV has also been shown to have immunosuppressive effects which predisposes animals to infection by other microorganisms⁴. Economic losses can be high due to these factors which is why herds should be monitored for the presence of infection.

Principle

The kit procedure is based on a solid phase indirect ELISA. In this procedure, samples are exposed to non-infectious BVDV antigen coated wells on microtitre plates or strips. BVDV antibodies (if present in the test sample) bind to the antigen in the well. The HRP conjugate added subsequently forms a complex with these BVDV antibodies. Unbound material is removed by rinsing before the addition of a substrate solution. Subsequently a blue colour develops which is due to the conversion of the substrate by the conjugate. A positive result is indicated by development of the blue colour. The reaction is stopped by addition of stop solution; the colour changes to yellow. The result can be read visually or by a microplate photometer, where the optical density (OD) is measured at 450 nm.

Materials needed but not provided

1. Precision pipettes
2. Disposable pipette tips
3. Distilled, deionised or any similar high quality water
4. Wash bottle, multichannel pipettor or plate washer
5. Container: 1 to 2 litres for PBS-Tween
6. Microplate photometer, 450 nm filter
7. Plate shaker

Specimen information

Individual serum or pools up to 10 samples:

10 µL of blood serum or plasma is needed for each sample well. Fresh, refrigerated or previously frozen serum or plasma may be tested.

Individual or pooled milk samples/bulk tank milk up to 50 animals:

100 µL of skim milk is required for each sample well. Fresh refrigerated or previously frozen milk samples may be tested. It is recommended to centrifuge milk samples for 15 minutes at 2000 x g to remove the lipid layer, or leave the milk samples until the fat layer is formed on top of the sample. Pipette under the fat layer.

Preparation of reagents

PBS-Tween Buffer:

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

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

Precautions

1. Carefully read and follow all instructions.
2. Store the kit and all reagents at 2-8°C (36-46°F).
3. All reagents should equilibrate to room temperature 18-25°C (64-77°F) before use.
4. Handle all materials according to the Good Laboratory Practice.
5. Do not mix components or instruction manuals from different test kit batches.
6. Care should be taken to prevent contamination of kit components.
7. Do not use test kit beyond date of expiry.
8. Do not eat, drink, or smoke where specimens or kit reagents are handled.
9. Use a separate pipette tip for each sample.
10. Do not pipette by mouth.
11. Include positive and negative control serum on each plate or test strip series.
12. Use only distilled deionised or any similar high quality water for preparation of reagents.
13. When preparing the buffers, etc., measure the required volume.
14. The Stop Solution contains sulphuric acid, which is corrosive.
15. All unused biological materials should be disposed according to the local, regional and national regulations.

Recommendations!

There is always a surplus volume of liquid reagents. The volume mentioned on the label is the minimum obtainable.

Strips with broken seal can be stored at 2-8°C (36-46°F) for up to 4 weeks.

Procedure

1. All reagents should equilibrate to room temperature 18-25°C (64-77°F) before use. Label each strip with a number.
2. Add samples
The provided negative and positive control sera are used for both serum and milk testing.

Serum Samples

- A. Add 90 µL of Sample Dilution Buffer to each well that will be used for serum samples and serum controls.
- B. Add 10 µL of Positive Control Serum (Reagent A) and 10 µL of Negative Control Serum (Reagent B) respectively to selected wells coated with BVDV viral antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the control sera in duplicates.
- C. Add 10 µL of serum sample to a selected well coated with BVDV viral antigen. The samples can be tested in singlicates or in duplicates. However, for confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.

Continue at step #3.

Milk Samples

- A. For addition of controls, see "Serum Samples" (point A and B).
- B. Add 100 µL of skim milk sample to a selected well coated with BVDV viral antigen. The samples can be tested in singlicates or in duplicates. However, for confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.

Continue at step #3.

3. Shake the plate thoroughly on a plate shaker for a few seconds. Seal the plate/strips and incubate at 37°C (98.6°F) for 1 hour, or at 2-8°C (36-46°F) over night (16-20 hours).
4. Rinse the plate/strips 3 times with PBS-Tween Buffer. At each rinse cycle fill up the wells, empty the plate and tap hard to remove all remains of fluid.
5. Add 100 µL of HRP Conjugate to each well. Seal the plate/strips and incubate at 37°C (98.6°F) for 1 hour.
6. Repeat step #4.
7. Add 100 µL Substrate Solution to each well. Incubate for 10 minutes at room temperature 18-25°C (64 -77°F). Begin timing when the first well is filled.
8. Stop the reaction by adding 50 µL of Stop Solution to each well and mix thoroughly. Add the Stop Solution in the same order as the Substrate Solution in step #7.
9. Measure the optical density (OD) of the controls and samples at 450 nm in a microplate photometer (use air as blank).
Measure the OD within 15 minutes after the addition of Stop Solution to prevent fluctuation in OD values.

Calculations

Calculations of results are done as described below.

Calculation of Percent Positivity Values (PP)

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

$$PP = \frac{OD_{\text{Sample or Negative control}}}{OD_{\text{Positive control}}} \times 100$$

Interpretation of the results

Criteria for test validity

To ensure validity, the duplicate OD values of the positive control should not differ more than 25 % from the mean value of the two duplicates.

Additionally, the control values should fall within the following limits:

- OD Positive Control > 0.7
- PP Negative Control, short incubation < 17
- PP Negative Control, long incubation < 30

Should any of these criteria not be fulfilled, the test is invalid. For invalid tests, technique may be suspected and the assay should be repeated.

If samples are tested in duplicates, each separate duplicate PP value should be equally interpreted, *i.e.* positive or negative. In case of discrepancy it is recommended to retest the sample. It is recommended to re-test all samples with a positive reaction with an ELISA with control antigen line, to eliminate any non-specific reacting samples *i.e.* the SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA, Art. No. 10-2200-02 and 10-2200-10.

Interpretation

Short incubation (1 hour incubation)

Sample	PP	Interpretation
Serum	< 20 ≥ 20	Negative Positive
Milk	< 12 ≥ 12	Negative Positive

Long incubation (over night incubation)

Sample	PP	Interpretation
Serum	< 30 ≥ 30	Negative Positive
Milk	< 17 ≥ 17	Negative Positive

References

1. Barber, D.M.L., Nettleton, P.F., and Herring, J.A. (1985) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 2, 459-464.
2. Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet. Microbiol. 8, 321-361.
3. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987). Comparison by the neutralization assays of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet. Microbiol. 13, 361-369.
4. Reggiardo, C., and Kaeberle, M.L. (1981) Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. The Am. J. of Vet. Res. 42, 218-221.



Produced by SVANOVA
Distributed by BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE



+33 (0) 4 26 78 47 60

Technical support



+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

Zusammensetzung	Artikelnummer 10-2200-50
Mikrotiterplatten Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) beschichtet mit nicht-infektiösem BVDV Antigen (versiegelt und trocken)	10 (Streifen) 12 x 8
Konjugat Gebrauchsfertig (Meerrettichperoxidase-konjugierte anti-Rind IgG monoklonale Antikörper)	1 x 120 ml
PBS-Tween-Lösung 20-fach konzentriert	2 x 125 ml
Probenverdünnungspuffer Gebrauchsfertig	1 x 120 ml
Substratlösung (Tetramethylbenzidin in Substratpuffern mit H ₂ O ₂) - IM DUNKELN AUFBEWAHREN!	1 x 100 ml
Stopplösung Enthält Schwefelsäure (2M) - ÄTZEND!	1 x 50 ml
A. Positives Kontrollserum - Enthält ein Konservierungsmittel	1 x 0,7 ml
B. Negatives Kontrollserum - Enthält ein Konservierungsmittel	1 x 0,7 ml

Diese Gebrauchsinformation umfasst den SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA mit der Artikelnummern 10-2200-50

Bovine Virus Diarrhoea Virus

Antikörper Test

Monophasisch

GEBRAUCHSINFORMATION; nach §17c
TierSG zugelassen; Zul.- Nr.: FLI-B 427

Name und Anwendung

Der SVANOVIR® BVDV-Ab Test ist ein Enzymgekoppelter Immuno-Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen BVDV in Blutserum, -plasma sowie in Milch, Einzel- und Sammelproben (inkl. Tankmilch) von Rindern.

Allgemeine Information

Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV), ein Pestivirus, ist assoziiert mit vielen Krankheiten des Verdauungstraktes von Rindern. Zu den klinischen Symptomen gehören Fieber, Durchfall und eine reduzierte Milchleistung. Infizierte Tiere zeigen eine hohe Morbidität in Verbindung mit einer geringen Mortalität¹. Wird eine trächtige Kuh infiziert kann es zu einer transplazentärer Infektion des Fötus kommen. Dadurch sind Fehlgeburten, mumifizierte Föten, Totgeburten oder Geburten von Kälbern mit schweren Anomalien möglich. Allerdings werden in vielen Fällen immuntolerante und klinisch unauffällige Kälber geboren, die eine persistente Virämie aufweisen und dadurch zu einer Übertragungsquelle des Virus werden². Überdies kann eine rekurrente Infektion dieser Kälber zu Erkrankungen der Schleimhäute (Mucosal Disease) führen³ - mit niedriger Morbidität, aber hoher Mortalität. Charakteristisch für diese Infektionen sind ausgedehnte Erosionen der Schleimhaut im Maul und im gastrointestinalen Bereich. Es konnte ferner gezeigt werden, dass BVDV eine immunsuppressive Wirkung hat, welche die Tiere anfälliger macht für Infektionen mit anderen Mikroorganismen⁴. Aufgrund dieser Faktoren können die wirtschaftlichen Verluste hoch ausfallen. Daher sollten Herden in Hinblick auf eine vorhandene Infektion überwacht werden.

Diagnostisches Verfahren

Bei dem Test in diesem Kit handelt es sich um einen indirekten ELISA. Die Platten sind mit nicht-infektiösem BVDV-Antigen beschichtet. Die BVDV-Antikörper (sofern in der Probe vorhanden) binden an das Antigen in der Vertiefung. Das anschließend zugegebene HRP-Konjugat bildet mit den BVDV-Antikörpern einen Komplex. Ungebundenes Material wird vor der Zugabe einer Substratlösung durch Waschvorgänge entfernt. Anschließend entwickelt sich aufgrund der Umwandlung des Substrats durch das Konjugat eine blaue Farbe, die ein positives Resultat anzeigt. Durch die Zugabe einer Stopp-Lösung wird die Reaktion beendet. Die Farbe wechselt zu gelb. Das Ergebnis kann visuell oder mit einem Photometer für Mikrotiterplatten gelesen werden, wobei die optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen wird.

Zusätzlich notwendiges Material

1. Präzisionspipetten
2. Einmalpipettenspitzen
3. Destilliertes, deionisiertes Wasser oder Wasser mit ähnlicher Qualität
4. Einrichtung zum Aufbringen und Absaugen der Waschlösung
5. Ein Behälter für die PBS-Tween-Puffer (1 bis 2 Liter)
6. Photometer für die Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter
7. Plattenrüttler

Probenvorbereitung

Serum: Einzelproben oder Sammelproben mit bis zu 10 Proben:

Für jede Probenvertiefung werden 10 µl Blutserum oder Plasma benötigt. Für den Test geeignet sind frische, gekühlte oder aufgetaute Serum- oder Plasmaproben.

Milch: Einzel- oder Tank-/Sammelproben von bis zu 50 Proben/Tiere:

Für jede Probenvertiefung werden 100 µl entrahmter Milch. Für den Test geeignet sind frische, gekühlte oder aufgetaute Milchproben. Es wird empfohlen, die Milchproben 15 Minuten bei 2000 x g zu zentrifugieren, um die Fettschicht zu entfernen oder die Milchproben solange stehen zu lassen, bis sich die Fettschicht über der Probe abgelagert hat. Unter der Fettschicht pipettieren.

Zubereitung der Reagenzien

PBS-Tween-Puffer:

Für die Bearbeitung einer Mikrotiterplatte verdünnen Sie 25 ml der 20-fach konzentrierten PBS-Tween-Lösung mit 475 ml destilliertem Wasser. Mischen Sie sorgfältig!

Anmerkung: Überprüfen Sie, ob sich in der Flasche kristalliner Niederschlag befindet. In diesem Fall bitte erwärmen und gut schütteln.

Besondere Hinweise

1. Alle Hinweise vor der Testdurchführung sorgfältig lesen und befolgen.
2. Das Test-Kit und alle Reagenzien bei 2-8°C lagern.
3. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur, (18-25°C) bringen.
4. Alle Materialien entsprechend den Richtlinien der guten Laborpraxis behandeln.
5. Nicht die Reagenzien und/oder Anweisungen verschiedener Tests untereinander vertauschen.
6. Kontamination der Testreagenzien verhindern.
7. Test nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr verwenden.
8. Während der Testdurchführung nicht essen, trinken oder rauchen.
9. Für jede Probe eine separate Pipettenspitze benutzen.
10. Nicht mit dem Mund pipettieren.
11. Bei jeder Testdurchführung muß eine positive und negative Kontrolle mitgeführt werden.
12. Ausschließlich destilliertes Wasser oder Wasser mit ähnlich hoher Qualität zur Herstellung der Testreagenzien verwenden.
13. Wenn Sie die verschiedenen Gebrauchslösungen herstellen, bitte das benötigte Volumen genau abmessen, da bei den flüssigen Reagenzien mehr Volumen als angegeben abgefüllt wurde.
14. Die Stopplösung enthält Schwefelsäure und ist daher ätzend.
15. Alle nicht verwendeten biologischen Materialien entsprechend den lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen entsorgen.

Hinweise

Die Angabe auf dem Etikett entspricht der minimal erhaltenden Menge. Es ist immer etwas mehr Flüssigkeit enthalten.

Nach Anbruch sind die Streifen bei 2- 8°C bis zu 4 Wochen haltbar.

Durchführung des Tests

1. Vor der Testdurchführung sämtliche Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Jeden Streifen mit einer Nummer versehen.

2. Proben zugeben.

Das negative bzw. positive Kontrollserum wird auch für die Testdurchführung bei Milchproben benutzt.

Serumproben

- A. 90 µl Probenverdünnungspuffer in jede für Serumproben und Serumkontrollen vorgesehene Vertiefung geben.
- B. 10 µl positives Kontrollserum (Reagenz A) beziehungsweise 10 µl negatives Kontrollserum (Reagenz B) in die mit BVDV-Antigen beschichteten Vertiefungen geben.
Es wird empfohlen, die Kontrollseren im Doppelansatz laufen zu lassen.
- C. 10 µl Serumprobe in die mit BVDV-Antigen beschichtete Vertiefung geben.
Die Proben können entweder einzeln oder im Doppelansatz getestet werden. Zur Sicherheit wird jedoch empfohlen, eine Doppelbestimmung der Proben vorzunehmen.
Fahren Sie mit der weiteren Durchführung des Tests fort wie ab Schritt 3 beschrieben.

Milchproben

- A. Für die Zugabe der Kontrollen siehe unter "Serumproben" (Punkt A und B).
- B. 100 µl Milchprobe in die mit BVDV-Antigen beschichtete Vertiefung geben.
Die Proben können entweder einzeln oder im Doppelansatz getestet werden. Zur Sicherheit wird jedoch empfohlen, eine Doppelbestimmung der Proben vorzunehmen.
Fahren Sie mit der weiteren Durchführung des Tests fort wie ab Schritt 3 beschrieben.

3. Die Platte für ein paar Sekunden auf einen Plattenrüttler stellen. Die Platte/Streifen versiegeln und für 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht (16-20h) bei 2-8°C inkubieren.
4. Die Platten/Streifen 3 Mal mit PBS-Tween-Puffer spülen: Bei jedem Spülvorgang die Vertiefungen anfüllen, die Platten entleeren und die verbleibende Flüssigkeit gründlich entfernen.
5. In jede Vertiefung 100 µl Konjugat geben die Platte/Streifen versiegeln und 1 Stunde bei 37°C inkubieren.
6. Schritt 4 wiederholen.
7. 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung geben und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18- 25°C) inkubieren. Die Zeitmessung beginnt mit dem Befüllen der ersten Vertiefung.
8. Durch Zugabe von 50 µl Stopplösung und sorgfältiges Vermischen die Reaktion beenden. Die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge zugeben wie die Substratlösung in Schritt 7.
9. Die Extinktionswerte (OD-Werte) der Kontrollen und Proben bei 450 nm mit einem Photometer für Mikrotiterplatten messen (Luft als Leerwert nehmen).
Die Extinktionswerte innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung messen, um Fluktuationen der Werte zu vermeiden.

Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt wie im Folgenden beschrieben:

Prozentuale Probenwerte (PP)

Die mittleren OD-Werte für jede Kontrolle berechnen.
Die OD-Werte der Proben bzw der negativen Kontrolle werden zum OD-Wert der positiven Kontrolle wie folgt in Beziehung gesetzt:

$$PP = \frac{OD_{\text{der Probe/des negative Kontrollserum}}}{OD_{\text{der positiven Kontrollserum}}} \times 100$$

Interpretation der Ergebnisse

Validitätskriterien

Um die Validität zu gewährleisten, sollte der OD-Wert der einzelnen Ergebnisse des Doppelansatzes vom positiven Kontrollserum um nicht mehr als 25 % vom Mittelwert des Doppelansatzes abweichen. Zusätzlich sollten die Kontrollwerte innerhalb der folgenden Grenzen liegen:

- OD Positive Kontrolle > 0,7**
- PP Negative Kontrolle, kurze Inkubation < 17**
- PP Negative Kontrolle, lange Inkubation < 30**

Sollte eines dieser Kriterien nicht erfüllt sein, ist der Test ungültig. Bei nicht gültigen Tests könnte ein Fehler aufgetreten sein und der Test sollte wiederholt werden.
Zur Bestätigung der Ergebnisse sollten die PP-Werte des Doppelansatzes einzeln ausgewertet werden und ein gleichermaßen positives und negatives Ergebnis aufweisen. Im Falle einer Diskrepanz wird eine erneute Untersuchung der Probe empfohlen.
Um unspezifisch positive Ergebnisse zu vermeiden, wird empfohlen alle positiven Proben mit dem biphasischen ELISA zu wiederholen d.h. der SVANOVIR® BVDV-AB ELISA, Artikelnummer 10-2200-02 und 10-2200-10.

Beurteilung der Probenergebnisse

Kurze Inkubation (1 Stunde)

Probe	PP	Beurteilung
Serum	< 20 ≥ 20	Negativ Positiv
Milch	< 12 ≥ 12	Negativ Positiv

Lange Inkubation (über Nacht)

Probe	PP	Beurteilung
Serum	< 30 ≥ 30	Negativ Positiv
Milch	< 17 ≥ 17	Negativ Positiv

Referenzen

1. Barber, D.M.L., Nettleton, P.F., and Herring, J.A. (1985) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 2, 459-464.
2. Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet. Microbiol. 8, 321-361.
3. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987). Comparison by the neutralization assays of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet. Microbiol. 13, 361-369.
4. Reggiardo, C., and Kaeberle, M.L. (1981) Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. The Am. J. of Vet. Res. 42, 218-221.



Hergestellt von SVANOVA
Verteilt von BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE



+33 (0) 4 26 78 47 60

Kundenservice



+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

Contenido	N° de artículo 10-2200-50
Microplacas Microplacas (96 pocillos) recubiertas con antígeno de VDVB no infeccioso (selladas y almacenadas en seco)	10 (Tiras) 12 x 8
Conjugado Listo para usar (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales IgG anti-bovinos)	1 x 120 ml
Solución PBS-Tween 20x concentrado	2 x 125 ml
Tampón para dilución de muestra Listo para usar	1 x 120 ml
Solución sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de sustrato con H ₂ O ₂) - ALMACENAR EN OSCURO¡	1 x 100 ml
Solución frenadora Contiene ácido sulfúrico (2M) - CORROSIVO¡	1 x 50 ml
A. Suero control positivo - Contiene conservante	1 x 0,7 ml
B. Suero control negativo - Contiene conservante	1 x 0,7 ml

Manual de kit SVANOVIR® BVDV-Ab:
N° artículo: 10-2200-50

Virus de la Diarrea Viral Bovina prueba para anticuerpos

Formato de monitoreo

Nombre y aplicación

SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA es un inmunoensayo (ELISA) para la detección de anticuerpos contra VDVb en suero bovino, plasma y leche; muestras individuales, mezcla de suero o leche y tanque de leche.

Información general

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), un pestivirus, está asociado con una serie de enfermedades que afectan al tracto alimentario del ganado. Los síntomas clínicos incluyen pirexia, diarrea y disminución de la producción de leche; con morbilidad alta pero mortalidad baja en animales infectados¹. La infección en vacas preñadas puede provocar una infección fetal transplacentaria. Los fetos pueden sufrir abortos, momificaciones, nacer muertos o nacer con anomalías graves. Sin embargo, en muchos casos, si los terneros nacen inmunotolerantes, las crías no nacen afectadas pero sí con viremia persistente y se convierten en fuentes de transmisión del virus². Además, la infección recurrente en esos terneros puede resultar en la llamada enfermedad de las mucosas³ – una condición con baja morbilidad pero con alta mortalidad, caracterizada por erosiones extensas en la mucosa oral y gastrointestinal. También se ha observado que el VDVB tiene efectos inmunosupresores que predispone a los animales a infecciones por otros microorganismos⁴. Dichos factores pueden ocasionar fuertes pérdidas económicas, por lo que debería monitorearse el hato para comprobar la presencia de la infección.

Principio

El procedimiento de este kit se basa en un ELISA indirecto en donde las muestras se exponen a un antígeno inactivado de VDVB inmovilizado en pocillos de microplacas/ tiras. Si las muestras contienen anticuerpos contra VDVB, estos reaccionarán con el antígeno inmovilizado en la microplaca. El conjugado de HRP (peroxidasa de rábano picante) agregado posteriormente, formará un complejo con los anticuerpos contra VDVB. Los reactivos en exceso se lavan antes de agregarse la solución sustrato. El resultado positivo se indica con la aparición de un color azulado. La reacción se detiene con la adición de la solución frenadora y el color cambiará a amarillo. El resultado puede leerse por medio de un fotómetro de microplacas, en el que se mide la densidad óptica (DO) a 450 nm.

Materiales necesarios (no suministrados)

1. Pipetas de precisión
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada, deionizada o cualquier otra agua altamente purificada
4. Botella para enjuague, sistema de enjuague de pipetas o placas multicanales
5. Recipiente: de 1 a 2 litros para PBS-Tween
6. Fotómetro para microplacas, filtro de 450 nm
7. Agitador de placas

Información de las muestras Suero individual o mezcla de hasta 10 muestras:

Se necesitan 10 µl de suero o plasma sanguíneo para cada pocillo /muestra. La prueba puede realizarse con suero o plasma recién obtenidos, refrigerados o congelados previamente.

Leche individual o conjunto de muestras de leche hasta de 50 muestras/animales:

Se requieren 100 µl de leche desnatada para cada pocillo/muestra. La prueba puede realizarse con leche recién obtenidos, refrigerados o congelados previamente.

Se recomienda centrifugar las muestras de leche durante 15 minutos a 2000 x g para retirar la capa de grasa (lípidos), o dejar reposar las muestras de leche hasta que se forme una capa de grasa en la superficie. Pipetear debajo de la capa de grasa.

Preparación de los reactivos

Tampón PBS-Tween:

Diluir la solución PBS-Tween 20 x en una proporción de 1/20 en agua destilada. Preparar 500 ml por placa añadiendo 25 ml de solución PBS-Tween a 475 ml de agua destilada y mezclar muy bien.

Nota: comprobar que no se ha producido precipitación de cristales en la botella. Si se observan cristales, la solución debe calentarse y agitarse bien.

Precauciones

1. Leer con atención y seguir todas las instrucciones.
2. Conservar el kit y todos los reactivos de 2-8°C.
3. Antes de su uso, debe dejarse que los reactivos alcancen temperatura ambiente de 18-25°C .
4. Manipular todos los reactivos observando las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).
5. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.
6. No contaminar los componentes del kit.
7. No utilizar el kit pasada la fecha de caducidad.
8. No comer, beber o fumar cuando se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
9. Utilizar puntas de pipetas distintas para cada muestra.
10. No usar la pipeta con la boca.
11. Incluir controles positivos y negativos de suero en cada serie de placas o tiras.
12. Para la preparación de los reactivos, utilizar únicamente agua destilada, deionizada o cualquier otra agua altamente purificada.
13. Cuando prepare la solución tampón etc. medir el volumen requerido.
14. La solución frenadora contiene ácido sulfúrico que es muy corrosivo.
15. Los materiales biológicos no utilizados deben desecharse siguiendo las normativas locales, regionales o nacionales.

Recomendaciones

Los reactivos líquidos, se envían siempre en volúmenes algo mayores. El volumen mencionado en la etiqueta de los frascos es el mínimo que se puede obtener.

Las tiras selladas una vez abiertas, pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C hasta 4 semanas.

Procedimiento

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

Muestras de suero

- A. Añadir 90 µl de Solución para dilución de muestras a cada pocillo que use para las muestras de suero y controles.
- B. Añadir 10 µl de suero control positivo (Reactivo A) y 10 µl de suero control negativo (Reactivo B) respectivamente a los pocillos seleccionados recubierta con antígeno VDVB. Para confirmación, se recomienda correr los controles de suero por duplicado.
- C. Añadir 10 µl de la muestra de suero a un pocillo recubierto con antígeno VDVB. Las muestras pueden ser procesadas individualmente o en duplicado. Sin embargo para propósito de confirmación se recomienda correr las muestras en duplicado.

Continuar con el paso #3.

Muestras de leche

- A. Para la adición del control positivo y control negativo ver "Muestras de suero" (paso A y B).
- B. Añadir 100 µl de muestra de leche a un pocillo recubierto con antígeno VDVB. Las muestras pueden ser procesadas individualmente o en duplicado. Sin embargo para propósito de confirmación se recomienda correr las muestras en duplicado.

Continuar con el paso #3.

3. Agitar la placa en agitador por unos segundos. Sellar la microplaca/tiras e incubar a 37°C por 1 hora o durante la noche (16-20 horas) a 2-8°C.
4. Enjuagar las placas/tiras 3 veces con solución PBS-Tween: en cada ciclo de enjuague, rellene los pocillos, vacíe la placa y golpéela sobre una superficie cubierta con material absorbente para eliminar todo resto de líquido.
5. Añadir 100 µl del conjugado HRP a cada pocillo e incubar a 37°C por 1 hora.
6. Repetir el paso # 4.
7. Añadir 100 µl de de la solución sustrato a cada pocillo e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Activar el cronómetro una vez que haya llenado el primer pocillo.
8. Interrumpir la reacción añadiendo 50 µl de solución frenadora a cada pocillo y mezclar bien. Añadir la solución frenadora en el mismo orden en que llenó con solución de sustrato en el paso #7.
9. Medir la densidad óptica (DO) de las muestras y controles a 450 nm con un fotómetro para microplacas (aire como blanco).

Medir la densidad óptica (DO) dentro de 15 minutos después de haber agregado la solución frenadora para así prevenir la fluctuación de los valores de DO.

Cálculos

Los cálculos de resultados se realizan de la siguiente forma:

Valores positivos porcentuales (PP)

Calcular los valores medios de DO de cada uno de los controles y muestras.

Todos los valores de DO de las muestras y controles negativos se relacionan con el valor de DO del control positivo:

$$PP = \frac{DO_{\text{Muestra o Control negativo}}}{DO_{\text{Control positivo}}} \times 100$$

Interpretación de los resultados
Interpretación de los resultados de la muestras

Para garantizar la validez, los valores de DO de los duplicados del control positivo no deben diferir más de un 25% de los valores medios de los dos duplicados. Además, los valores de control deben clasificarse dentro de los siguientes límites:

- DO Control positivo > 0.7
- PP Control negativo, incubación corta < 17
- PP Control negativo, incubación larga < 30

En el caso de que cualquiera de estos criterios no se cumpla, la prueba no es válida. Para las pruebas no válidas, probablemente la técnica no sea la indicada y la prueba debe repetirse. Para confirmar los resultados de la prueba, deben interpretarse por igual y por separado los valores duplicados de PP positivos y negativos. En caso de discrepancia, se recomienda repetir la prueba. Para descartar cualquier muestra de reacción dudosa se recomienda repetir la prueba de todas las muestras con reacción positiva en un ELISA con un antígeno de control, es decir SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA, N° de artículo 10-2200-02 o 10-2200-10.

Interpretación de los resultados de la muestra

Incubación corta (1 hora)

Muestra	PP	Interpretación
Suero	< 20 ≥ 20	Negativo Positivo
Leche	< 12 ≥ 12	Negativo Positivo

Incubación larga (durante la noche)

Muestra	PP	Interpretación
Suero	< 30 ≥ 30	Negativo Positivo
Leche	< 17 ≥ 17	Negativo Positivo

Referencias

1. Barber, D.M.L., Nettleton, P.F., and Herring, J.A. (1985) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 2, 459-464.
2. Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet. Microbiol. 8, 321-361.
3. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987). Comparison by the neutralization assays of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet. Microbiol. 13, 361-369.
4. Reggiardo, C., and Kaeberle, M.L. (1981) Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. The Am. J. of Vet. Res. 42, 218-221.



Kit fabricado por SVANOVA
Kit distribuido por BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE



+33 (0) 4 26 78 47 60

Servicio al cliente



+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

Contenu	N° d'article 10-2200-50
Microplaques Microplaques (96 puits) sensibilisés avec l'antigène non infectieux de VDV-B (scellées et gardées au sec)	10 (Barrettes) 12 x 8
Conjugué Prêt à l'emploi (peroxydase de raifort conjugué à des anticorps monoclonaux IgG antibovins)	1 x 120 mL
Solution de PBSTween Concentrée 20 fois	2 x 125 mL
Tampon de dilution des échantillons Prêt à l'emploi	1 x 120 mL
Solution de substrat (Tétraméthylbenzidine dans le tampon de substrat contenant H ₂ O ₂) - CONSERVER À L'OBSCURITÉ!	1 x 100 mL
Solution d'arrêt Contient de l'acide sulfurique (2M) - CORROSIF!	1 x 50 mL
A. Sérum de contrôle positif - Contient des agents conservateurs	1 x 0,7 mL
B. Sérum de contrôle négatif - Contient des agents conservateurs	1 x 0,7 mL

Ce manuel concerne la trousse
SVANOVIR® BVDV-Ab:
N° d'article 10-2200-50

Test d'anticorps du Virus de la Diarrhée Bovine Virale

Format de dépistage

Nom et application

SVANOVIR® BVDV-Ab est une trousse de détection immunoenzymatique des anticorps spécifiques du virus BVD dans le sérum, le plasma et le lait, individuel, mélanges et le lait de citerne.

Information générale

Le virus de la diarrhée virale bovine (VDVB), un pestivirus, est associé à une série de maladies affectant l'appareil digestif des bovins. Les signes cliniques incluent la pyrexie, la diarrhée et la baisse du rendement laitier. La morbidité est élevée mais la mortalité est faible chez les animaux infectés¹. L'infection de vaches gestantes peut conduire à une infection transplacentaire du fœtus. Les fœtus peuvent être avortés, momifiés, mort-nés ou peuvent naître avec de graves anomalies. Toutefois, dans de nombreux cas, des veaux, immunotolérants, sont nés sans symptômes apparents mais avec une virémie persistante et sont devenus des sources de transmission du virus². De plus, l'infection récurrente de ces veaux peut provoquer la maladie des muqueuses³; un état induisant une faible morbidité mais une mortalité élevée. Elle se caractérise par des érosions étendues des muqueuses orales et gastro-intestinales. Il a été également démontré que le VDVB a des effets immunosuppresseurs qui prédisposent les animaux aux infections par d'autres microorganismes⁴. Les pertes économiques peuvent être importantes en raison de ces facteurs, c'est pourquoi la présence de ces infections devrait être surveillée régulièrement dans les troupeaux.

Principe

La méthode repose sur un test immunoenzymatique indirect en phase solide (ELISA indirect). Dans cette méthode, les échantillons de sérum ou de lait sont exposés à un antigène VDVB non-infectieux incorporé à des complexes immunostimulants tapissant les puits de barrettes ou de plaques de microtitration. Les anticorps anti-VDVB (si l'échantillon en contient) se lient à l'antigène dans les puits. Le conjugué HRP ajouté ensuite forme un complexe avec ces anticorps anti-VDVB. L'excès en anti-corps non liés est éliminé par rinçage avant l'ajout de la solution de substrat. Suite à cela, une couleur bleue se développe. Elle est due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'ajout de la solution d'arrêt; la couleur tourne alors au jaune. Le résultat peut être lu visuellement ou à l'aide d'un photomètre pour microplaques en mesurant la densité optique (DO) à 450 nm.

Matériels nécessaires mais non fournis

1. Micropipettes de précision
2. Embouts jetables pour micropipette
3. Eau distillée, désionisée ou de l'eau ultrapure
4. Pissette, pipette à canaux multiples ou laveur de microplaques.
5. Récipient de 1 à 2 litres pour le PBS Tween
6. Photomètre à microplaques (filtre de 450 nm)
7. Agitateur de plaques

Information sur les échantillons

Sérum individuel ou mélanges de jusqu'à 10 échantillons:

Un volume de 10 µL de sérum sanguin ou de plasma est requis pour chaque puits. Des sérums ou des plasma frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

Lait individuel ou mélanges d'échantillons de lait ou de lait de citerne de jusqu'à 50 animaux:

Un volume de 100 µL de lait écrémé est requis pour chaque puits. Le lait frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés. Il est recommandé de centrifuger préalablement les échantillons de lait pendant 15 minutes à 2000 x g pour éliminer la couche lipidique, ou de laisser reposer les échantillons de lait jusqu'à ce qu'une couche de graisse se forme à la surface. Ensuite pipeter sous la couche de graisse formée.

Préparation des réactifs

Tampon PBS-Tween:

Diluer 1/20 la solution concentrée de PBS-Tween dans de l'eau purifiée. Préparer 500 mL par plaque en diluant 25 mL dans 475 mL d'eau et bien mélanger.

N.B. Avant la dilution, s'assurer qu'il ne reste pas de cristaux dans le tampon. Pour dissoudre les restes de cristaux, réchauffer et bien mélanger.

Précautions

1. Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement.
2. Conserver la trousse et tous les réactifs entre 2-8°C.
3. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante entre 18-25°C avant usage.
4. Manipuler tout le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
5. Ne pas mélanger des composantes ni confondre des monographies de différentes séries de trousse.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composantes de la trousse.
7. Respecter la date de péremption de la trousse.
8. Ne pas manger, boire, ni fumer là où sont manipulés les échantillons et les réactifs.
9. Changer d'embout de micropipette pour chaque échantillon.
10. Ne jamais pipeter à la bouche.
11. Inclure des contrôles de sérum négatifs et positifs sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, désionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Quand les solutions, etc.. sont préparées, mesurer la quantité nécessaire.
14. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique, qui est corrosif.
15. L'élimination des matériaux biologiques non utilisés doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations!

Il ya toujours un surplus de volume pour le réactif liquide. Le volume mentionné sur l'étiquette est le minimum à obtenir.

Les barettes dont l'emballage est ouvert peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines au maximum.

Protocole

1. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante, entre 18-25°C, avant utilisation. Étiqueter chaque barrette en lui affectant un numéro.

2. Préparer les échantillons.

Les sérums contrôles positifs et négatifs fournis seront utilisés pour la détection d'anticorps aussi bien au niveau du sérum qu'au niveau du lait.

Échantillons de sérum

- A. Déposer 90 µL de tampon de dilution des échantillons dans chaque puits qui servira pour les échantillons de sérum et les contrôles de sérum.
- B. Déposer 10 µL de sérum de contrôle positif (réactif A) et 10 µL de sérum de contrôle négatif (réactif B) dans des puits sélectionnés sensibilisés d'antigène viral de VDVB. Pour une confirmation, il est recommandé de préparer et d'utiliser les sérums de contrôle en duplicata.
- C. Déposer 10 µL d'échantillon de sérum dans un puits sélectionné sensibilisés d'antigène viral de VDVB. Les échantillons peuvent être testés individuellement ou en duplicata. Pour confirmation du résultat, il est toutefois recommandé de traiter les échantillons en duplicata.

Poursuivre à l'étape 3.

Échantillons de lait

- A. Pour l'ajout des contrôles, se référer à "Échantillons de sérum" (point A et B)
- B. Déposer 100 µL d'échantillon de lait écrémé dans un puits sélectionné sensibilisés d'antigène de VDVB. Les échantillons peuvent être testés individuellement ou en duplicata. Pour confirmation du résultat, il est toutefois recommandé de traiter les échantillons en duplicata.

Poursuivre à l'étape 3.

3. Agiter l'ensemble de la plaque à l'aide d'un agitateur de plaques pendant quelques secondes. Couvrir la plaque/ barrette avec un scellant adhésif et incubé à 37°C pendant 1 heure, ou toute la nuit (16-20h) à 2-8°C.
- 4 Rincer les plaques 3 fois avec le tampon PBS Tween: A chaque cycle de rinçage, remplir les puits et vidanger la plaque en tapant vigoureusement pour éliminer tout reste de fluide.
5. Déposer 100 µL de conjugué HRP dans chaque puits. Couvrir la plaque/les barrettes avec un scellant adhésif et incubé à 37°C pendant 1 heure.
6. Répéter la procédure de lavage du point 4.
7. Déposer 100 µL de la solution de substrat dans chaque puits et incubé pendant 10 minutes à la température ambiante entre 18-25°C. Commencer le décompte quand le premier puits est rempli. Arrêter la réaction en ajoutant 50 µL de solution d'arrêt dans chaque puits et mélanger soigneusement. Déposer la solution d'arrêt dans le même ordre des puits que la solution de substrat au point 7.
8. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm dans un spectrophotomètre à microplaques (utiliser l'air comme blanc). Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt pour éviter la fluctuation des valeurs de DO.

Calculs

Le calcul des résultats est effectué tel que décrit ci-dessous.

Calcul des valeurs de pourcentage de positivité (PP)

Calculer la valeur de densité optique moyenne (DO) pour chaque témoin contrôle. Toutes les valeurs de DO concernant les échantillons tests ainsi que le contrôle négatif, sont calculées par rapport à la valeur de DO du contrôle positif comme suit:

$$PP = \frac{DO_{\text{échantillon/contrôle négatif}}}{DO_{\text{contrôle positif}}} \times 100$$

Interprétation des résultats

Critères de validité du test

Pour garantir la validité des tests, le double de la valeur de DO de chaque puits d'un contrôle positif ne doit pas s'écarter de plus de 25 % de la valeur moyenne des deux duplicatas.

De plus, les valeurs des DO des contrôles doivent être situés dans les limites suivantes:

- DO Contrôle positif > 0.7
- PP Contrôle négatif, Incubation de courte durée < 17
- PP Contrôle négatif, Incubation de longue durée < 30

Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'essai n'est pas validé. Pour les essais non validés, la technique peut être suspectée, et l'essai doit être répété.

Pour confirmer les résultats de l'échantillon test, chaque valeur PP distincte en duplicata doit être interprétée de manière égale, à savoir positive et négative. En cas de divergence, il est recommandé d'analyser à nouveau l'échantillon.

Il est recommandé de procéder à un nouveau test de tous les échantillons présentant une réaction positive à un ELISA avec antigène de contrôle, pour éliminer tout échantillon dont la réaction est douteuse, c'est-à-dire SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA, N° d'article 10-2200-02 et 10-2200-10.

Interprétation du résultat de l'échantillon test

Incubation de courte durée (1 heure)

Échantillon	PP	Interprétation
Sérum	< 20 ≥ 20	Négatif Positif
Lait	< 12 ≥ 12	Négatif Positif

Incubation de longue durée (toute la nuit)

Échantillon	PP	Interprétation
Sérum	< 30 ≥ 30	Négatif Positif
Lait	< 17 ≥ 17	Négatif Positif

Bibliographie

1. Barber, D.M.L., Nettleton, P.F., and Herring, J.A. (1985) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 2, 459-464.
2. Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet. Microbiol. 8, 321-361.
3. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987). Comparison by the neutralization assays of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet. Microbiol. 13, 361-369.
4. Reggiardo, C., and Kaeberle, M.L. (1981) Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. The Am. J. of Vet. Res. 42, 218-221.



Kit fabriqué par SVANOVA
Kit distribué par BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE



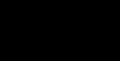
+33 (0) 4 26 78 47 60

Support technique



+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

Symbols/Symbolen/Símbolos/Symboles

	Article No. / Artikelnummer / Nº de artículo / Nº d'article
	Serial (batch) No. / Ch.-B / Nº de lote / Nº de série (lot)
	Temperature limit / Lagerungstemperatur / Límite de temperatura / Limite de température
	Expiry date / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Date de péremption
	Corrosive / Ätzend / Corrosivo / Corrosif
	Number of samples / Anzahl proben / Nº de muestras / Nombre des échantillons
	See manual / Siehe Gebrauchsinformation / Ver el manual / Voir le manuel
	Manufacturer / Hersteller / Fabricante / Fabricant
	Telephone / Telefon / Teléfono / Téléphone
	Fax

Boehringer Ingelheim
Svanova
Box 1545
SE-751 45 Uppsala,
Sweden
www.svanova.com

Phone +46 18 65 49 00
Fax +46 18 65 49 99
info@svanova.com