

SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab

**Transmissible Gastroenteritis Virus/
Porcine Respiratory Coronavirus
Differentiating Test**
Antibody Test

**Transmissibles Gastroenteritis Virus/
Porcines Respiratorisches Coronavirus Differenzierungstest**

**Análisis Diferencial entre el Virus de la Gastroenteritis
Transmisible Porcina y el Coronavirus Respiratorio Porcino**

**Test de différenciation entre le virus de la gastro-entérite
transmissible et le coronavirus respiratoire porcin**

Contents	Art.No. 10-7500-02
Microtitre plate Microtitre plates (96 wells) coated with non-infectious TGEV antigen (sealed and stored dry)	2 (Strips) 12 x 8
Conjugate Concentrate (horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibodies)	1 x 30 µL
PBS-Tween Solution 20x concentrate	1 x 125 mL
Conjugate Dilution Buffer - Contains preservatives	1 x 25 mL
Substrate Solution (Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H ₂ O ₂) - STORE IN THE DARK!	1 x 20 mL
Stop Solution Contains sulphuric acid (2M) - CORROSIVE!	1 x 10 mL
Anti-TGEV mAb Solution - Contains 0.07% ProClin	1 x 10 mL
Anti-TGEV/PRCV mAb Solution - Contains 0.07% ProClin	1 x 10 mL
A. Positive TGEV Control Serum - Contains 0.07% ProClin	1 x 2.5 mL
B. Negative TGEV/PRCV Control Serum - Contains 0.07% ProClin	1 x 2.5 mL
C. Positive PRCV Control Serum - Contains 0.07% ProClin	1 x 2.5 mL

This manual covers the following
SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab kit:
Article number 10-7500-02

Transmissible Gastroenteritis Virus/Porcine Respiratory Coronavirus Differentiating Test Antibody Test

Name and Application

The SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab test kit is an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) designed to differentiate between TGEV and PRCV specific antibodies in porcine serum. A maximum of 88 porcine sera can be tested with the kit.

General information

Transmissible gastroenteritis (TGE) is a highly contagious viral enteric disease of swine characterised by vomiting, watery diarrhoea, anorexia and dehydration. Mortality is high in younger piglets. Suckling pigs older than 3 weeks usually survive the disease. The clinical signs in adult pigs are limited to loss of appetite and diarrhoea. The disease is caused by the coronavirus TGEV (transmissible gastro-enteritis virus). Ingested TGEV replicates primarily in the villous epithelial cells of the small intestine¹. Milk and faeces are the main sources of virus transmission from carrier animals. Starlings and houseflies can act as mechanical vectors for the virus. The porcine respiratory coronavirus (PRCV) is antigenically related to TGEV but replicates primarily in the tonsils and the respiratory tract^{2,3}. PRCV may cause pneumonia in swine⁴. Normally PRCV induce only mild or no clinical respiratory signs^{5,6}. Because PRCV and TGEV have many similar antigenic sites on the surface of the virus^{7,8} and the problems encountered with carrier animals, it is important to clearly differentiate between these two viruses in a routine diagnostic test.

Principle

The kit procedure is based on the blocking ELISA. In this procedure samples are exposed to non-infectious TGEV antigen-coated wells in microtitre plates or strips. If anti-TGEV or anti-PRCV antibodies are present in the test sample they will bind to viral antigens in the well and block these antigenic sites. If anti-TGEV or anti-PRCV antibodies are absent in the sample these sites will remain free. When anti-TGEV or anti-TGEV/PRCV monoclonal antibodies are added they will attach to specific free sites on the virus. By adding horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse Ig antibodies they will bind to the monoclonal antibodies present in the well. When the substrate is added a blue colour develops. A negative result is indicated by a strong colour change. The reaction is stopped by addition of stop solution; the colour changes to yellow. The optical density (OD) is measured at 450 nm in a microplate photometer and the percent inhibition of the positive controls (A, C) and test samples relative to the negative control (B) is calculated.

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. Containers: 1 to 2 litres for PBS-Tween and 20 mL for Conjugate Solution
6. Microplate photometer, 450 nm filter

Specimen information

2 x 50 µL of undiluted blood serum is required for each sample. Each test sample requires the use of two sample wells. Fresh, refrigerated or previously frozen serum can be used.

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.

HRP Conjugate Solution:

Dilute the HRP Conjugate Concentrate in Conjugate Dilution Buffer according to the given dilution factor (f) on the label of the conjugate vial. Prepare the reagent immediately before use and mix it thoroughly on a shaker. Prepare 10 mL for one 96 well plate or 1 mL for each 8 well strip. Discard any unused solution.

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 sera (3 controls) 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!

The volume of reagents is sufficient for at least 10 separate test occasions. 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. Wash the plates/strips 3 times with PBS-Tween buffer: fill up the wells at each wash, leave the plate with the buffer 1 minute, empty the plates and tap hard to remove all remains of fluid.

3. Add 100 µL of Positive Control Serum (A and C) and 100 µL of Negative Control Serum (B) to selected wells. It is recommended to run the control sera in duplicates — see figure 1.

4. Add 50 µL of PBS-Tween and 50 µL of each undiluted serum sample to selected wells. Add samples in duplicates.

5. Shake the plate thoroughly by tapping it on the side. Seal the plate/strips and incubate for 2 hours at +37°C (98.6 °F).

6. Repeat step #2.

7. Add 100 µL Anti-TGEV Solution to one of the test sample wells and add 100 µL Anti-TGEV/PRCV Solution to the other test sample well. Repeat this step for each pair of controls and samples (see figure #1).
8. Seal the plate/strips and incubate for 30 minutes at room temperature 18-25°C (64-77°F).

9. Repeat step #2.

10. Add 100 µL of diluted HRP Conjugate Solution to each well, seal the plate/ strips and incubate for 30 minutes at room temperature 18-25°C (64-77°F).

11. Repeat step #2.

12. Add 100 µL Substrate Solution to each well and incubate for 30 minutes at room temperature 18-25°C (64-77°F). Begin timing when the first well is filled.

13. Stop the reaction by adding 50 µL Stop Solution to each well and mix content of wells thoroughly. Add the Stop Solution in the same order as the Substrate Solution in step #12.

14. 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 fluctuations in OD values.

Figure #1: Recommended process chart for addition of controls and samples

	1	2	3	4
A	Control A	Control A	Sample 5	Sample 5
B	Control B	Control B	Sample 6	Sample 6
C	Control B	Control B	Sample 7	Sample 7
D	Control C	Control C	Sample 8	Sample 8
E	Sample 1	Sample 1	Sample 9	Sample 9
F	Sample 2	Sample 2	Sample 10	Sample 10
G	Sample 3	Sample 3	etc.	etc.
H	Sample 4	Sample 4	etc.	etc.
	Anti-TGEV solution	Anti-TGEV/PRCV solution	Anti-TGEV solution	Anti-TGEV/PRCV solution

Calculations

N.B. All calculations must be done for the TGEV and the TGEV/PRCV mAb solution separately.

1. Calculate the mean optical density (OD) value for each of the controls and samples.
2. Calculate the percent inhibition (PI) values for the positive controls as well as samples, using the following formula:

$$PI = \frac{OD_{Neg. control} - OD_{Sample or Pos. control}}{OD_{Negative control}} \times 100$$

Interpretation of the results

Criteria for test validity

To ensure test validity the TGEV/PRCV Negative Serum Control (B) should have an OD value greater than 0.5 and the Control Sera A and C as follows:

% Inhibition (PI)		
	Anti-TGEV	Anti TGEV/PRCV
A	> 60	> 60
C	< 15	> 60

Interpretation

PI	> 60	positive	(+)
PI	45-60	doubtful	(+/-)
PI	< 45	negative	(-)

Serum samples with any PI-values falling in the doubtful zone(+/-) should be interpreted as inconclusive or invalid and assay must be repeated. If still inconclusive or invalid a new sample with at least 3 weeks interval should be tested.

Anti-TGEV	Anti-TGEV/PRCV	Interpretation
-	-	Negative for both TGEV and PRCV
-	+	Positive for PRCV (negative for TGEV)
+	+	Positive for TGEV
+/-	-	Invalid test result*
+	-	Invalid test result*
+	+/-	Invalid result**
+/-	+	Inconclusive for TGEV
-	+/-	Inconclusiv for PRCV
+/-	+/-	Inconclusive for TGEV and PRCV

* Some sera with high levels of antibodies to PRCV may show a negative reaction in the blocking ELISA due to a prozone phenomena. These sera will score positive when tested at a higher dilution (for example 1/250 or 1/500).

**Invalid test result due to either prozone phenomena (see*), or technical error in performing the test.

Data from Canadian study (Herd basis)

Study Reference	Sample Size (nos. of herds) ¹ Kit/reference ²				Sample Type	Relative Sensitivity and Specificity (95% Confidence Interval)
	+/+	-/+	+/-	-/-		
J. Vet. Diag. Invest. (2002) 14:97-105 ⁹	28	2	4	66	Serum	Sensitivity: 93.3 (77.9%, 99.2%) Specificity: 94.3% (86%, 98.4%)

1. Known serological status

2. Clinical signs

References

1. Saif, L. J. and Bohl, E. H. (1986) Transmissible Gastroenteritis. In Diseases of Swine 6th Edition. Edited by A.D. Leman, R.D. Glock, W. C. Mengeling, R.H. Penny, E. Scholl, and B. Straw. Iowa State Uni. Press, Ames, Iowa U.S.A. pp. 255-274.
2. Furuuchi, S., Shimizu, Y., and Kumagai, T. (1978/1979) Multiplication of low and high cell culture passaged strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn piglets. Vet. Microb. 3, 169-178.
3. Kemeny, L. J., Wiltsey, V. L., and Riley, J. L. (1975) Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected pig-lets. Cornell Vet. 65, 352-362.
4. van Nieuwstadt, A. P. and Pol, J. M. A. (1989) Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. Vet. Rec. 124, 43-44.
5. Brown, I. and Cartwright, S. F. (1986) New porcine coronavirus? Vet. Rec. 119, p. 282.
6. Pensaert, M., Callebaut, P. and Vergote, J. (1986) Isolation of a porcine respiratory non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. The Veterinary Quarterly. 8, 257-260.
7. Garwes, D. J., Stewart, F., Cartwright, S. F. and Brown, I. (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. Vet. Rec. 122, 86-87.
8. Callebaut, P. *et al.* (1988). Antigenic differentiation between TGEV of swine and a related porcine respiratory coronavirus. J. Gen. Virol.
9. Carman, S. *et al.* (2002). Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. J. Vet. Diagn. Inves.t 14:97-105.



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 10-7500-02
Mikrotiterplatten Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) beschichtet mit nicht-infektiösem TGEV Antigen (versiegelt und trocken)	2 (Streifen) 12 x 8
Konjugat Konzentrat (Meerrettichperoxidase-konjugierte anti-Maus-IgG Antikörper)	1 x 30 µl
PBS-Tween-Lösung 20-fach konzentriert	1 x 125 ml
Konjugatverdünnungspuffer - Enthält 0,07% ProClin	1 x 25 ml
Substratlösung (Tetramethylbenzidin in Substratpuffer mit H ₂ O ₂) - IM DUNKELN AUFBEWAHREN!	1 x 20 ml
Stopplösung - Enthält Schwefelsäure (2M) - ÄTZEND!	1 x 10 ml
Anti-TGEV mAk Lösung - Enthält 0,07% ProClin	1 x 10 ml
Anti-TGEV/PRCV Lösung - Enthält 0,07% ProClin	1 x 10 ml
A. Positives TGEV Kontrollserum - Enthält 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml
B. Negatives TGEV/PRCV Kontrollserum - Enthält 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml
C. Positives PRCV Kontrollserum - Enthält 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml

Diese Gebrauchsinformation umfasst die SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab Testkits mit den Artikelnummer: 10-7500-02

Transmissibles Gastroenteritis Virus/ Porcines Respiratorisches Coronavirus Differenzierungstest

GEBRAUCHSINFORMATION; nach §17c
TierSG zugelassen; Zul.-Nr.: FLI-B 430

Name und Anwendung

Der SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab Test ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Differenzierung von Antikörpern gegen das Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) und des porcinen Respiratorischen Coronavirus (PRCV) in Blutserum von Schweinen. Maximal 88 Proben (Vertiefungen für Kontrollen ausgenommen) können mit dem Kit getestet werden.

Allgemeine Information

Die transmissible Gastroenteritis (TGE) ist eine hochgradig ansteckende virale Darmerkrankung bei Schweinen, die sich durch folgende Symptome äußert: Erbrechen, wässrige Diarrhöe, Anorexie und Dehydrierung. Sie geht bei jungen Ferkeln mit einer hohen Mortalität einher. Saugferkel, die älter als 3 Wochen sind, überleben diese Krankheit für gewöhnlich. Die klinische Symptomatik bei adulten Schweinen beschränkt sich auf Inappetenz und Diarrhöe. Die Erkrankung wird durch das Coronavirus TGEV (transmissible gastroenteritis virus) ausgelöst. Das aufgenommene TGEV repliziert sich vorwiegend in den absorbierenden Epithelzellen des Dünndarms¹. Milch und Fäkalien zählen zu den Hauptquellen einer Virusübertragung von Trägartieren. Vögel und Fliegen können als mechanische Vektoren für das Virus dienen. Das porcine respiratorische Coronavirus (PRCV) ist antigenetisch mit TGEV verwandt, repliziert sich jedoch vorwiegend in den Tonsillen und im Respirationstrakt^{2,3}. PRCV kann bei Schweinen eine Pneumonie verursachen⁴. Im Normalfall bewirkt PRCV nur schwache oder gar keine klinischen respiratorischen Zeichen^{5,6}. Vor der Integration in eine neue Herde empfiehlt es sich, das Blut der Schweine auf das Vorhandensein von Anti-TGEV-Antikörpern zu untersuchen, um das Infektionsrisiko für den TGEV-freien Bestand zu reduzieren. Viele Länder fordern, dass Schweine als TGEV-frei zertifiziert werden, bevor eine Importerlaubnis erteilt wird. PRCV und TGEV verfügen auf

ihrer Virusoberfläche über eine Vielzahl ähnlicher antigener Bereiche^{7,8}. Aufgrund der mit den Trägartieren in Zusammenhang stehenden Probleme ist es wichtig, in einem Routinediagnostiktest diese beiden Virentypen eindeutig voneinander zu unterscheiden.

Diagnostisches Verfahren

Der SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab-Test, ein "Blocking-ELISA", differenziert zwischen TGEV- und PRCV-Antikörpern im Blutserum. In den Reaktionsvertiefungen fixiertes, inaktiviertes TGEV-Antigen bindet im zu testenden Serum, das in zwei Reaktionsvertiefungen gegeben wird, vorhandene TGEV-Antikörper. Anschließend werden in die eine Vertiefung monoklonale TGEV-Antikörper und in die andere Vertiefung monoklonale TGEV/PRCV-Antikörper hinzugegeben. Beide monoklonale Antikörper werden blockiert und durch einen Waschvorgang weggespült. Das zugefügte HRP-Konjugat kann nicht an die spezifischen Antikörper binden; das danach benutzte Substrat kann nicht gespalten werden; es kommt zu keiner Farbreaktion; der Test ist in beiden Vertiefungen positiv. Sind im zu testenden Serum PRCV-Antikörper vorhanden, so werden diese auch vom Antigen gebunden; von den beiden (in verschiedene Reaktionsvertiefungen) hinzuzugebenden monoklonalen Antikörpern wird jedoch nur der "TGEV-spezifische gebunden; der "TGEV-/PRCV-" spezifische wird geblockt und durch einen Waschvorgang weggespült. Das zugefügte HRP-Konjugat bindet an die TGEV-spezifischen Antikörper; das danach benutzte Substrat wird gespalten; es kommt nur zu einer Farbreaktion, in der Reaktionsvertiefung, der der "TGEV"-spezifische Antikörper zugegeben wurde, hier ist der Test negativ. In der Reaktionsvertiefung, in die der "TGEV/PRCV"-spezifische Antikörper zugegeben wurde, kann das Konjugat nicht binden, es

kommt zu keiner Farbreaktion, der Test ist positiv. Sind im zu testenden Serum keine Antikörper gegen TGEV und PRCV, so kommt es in beiden Reaktionsvertiefungen zu einer Farbreaktion; der Test ist in beiden Vertiefungen negativ.

Zusätzlich notwendiges Material

1. Präzisionspipetten
2. Einmalpipettenspitzen
3. Destilliertes, deionisiertes Wasser oder Wasser mit ähnlichem Qualität
4. Einrichtung zum Aufbringen und Absaugen der Waschlösung
5. Behälter: 1 bis 2 Liter für PBS-Tween Puffer und 20 ml für Konjugat-Lösung
6. Photometer für die Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter

Probenvorbereitung

Serum:

Es kann frisches, kühl aufbewahrtes oder gefrorenes und aufgetautes Blutserum benutzt werden. Für eine Untersuchung werden 2x50 µl Serum benötigt.

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.

Konjugatlösung:

Verdünnen Sie das HRP-Konjugat-Konzentrat mit Konjugatverdünnungspuffer laut des Konjugatverdünnungsfaktors (f) der auf der Konjugatflasche angegeben ist. Die Lösung kurz vor der Anwendung zubereiten. Vernichten Sie die nicht benutzte Konjugatlösung nach Gebrauch!

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 müssen positive und negative Kontrollseren (3 Kontrollen) 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 Menge der Reagenzien ist für mindestens 10 verschiedene Testdurchführungen ausreichend.

Streifen mit beschädigter Abdeckung können bei 2-8°C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

Durchführung des Tests

1. Alle Reagenzien sollen Raumtemperatur, 18-25°C, haben.

2. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterplatten der Umhüllung.

3. Spülen Sie die Mikrotiterplatte/ den Streifen dreimal mit PBS-Tween Puffer (mind 300 µl pro Vertiefung), entfernen Sie dann die Flüssigkeit gründlich. Bei jedem Spülgang, bitte die Platte mit gefüllten Vertiefungen eine Minute stehen lassen vor der Entfernung der Flüssigkeit. Nach dem letzten Spülgang entfernen Sie die Flüssigkeit gründlich. Beginnen Sie sofort mit dem nächsten Arbeitsschritt!

4 Geben Sie je 100 µl der Kontrollseren A, B und C in die vorgesehenen Vertiefungen; das Kontrollserum B (negative Kontrolle) im Doppelansatz (siehe Abbildung 1).

5. Geben Sie je 50 µl PBS-Tween Puffer in die für die dafür vorgesehenen Vertiefungen, (siehe Abbildung 1).

6. Geben Sie je 50 µl der nicht vorverdünnten Serumproben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen, (siehe Abbildung 1).

7. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 37°C.
8. Schritt 3 wiederholen.

9. Geben Sie in die eine Vertiefung für die Serumproben und Kontrollseren (Reihen 1, 3, 5 usw.) 100 µl Anti-TGEV-Lösung und in die andere (Reihen 2, 4, 6 usw.) 100 µl Anti-TGEV/PRCV-Lösung, (siehe Abbildung 1).

10. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur 18-25°C.

11. Schritt 3 wiederholen.

12. Geben Sie in jede Vertiefung 100 µl der Konjugatlösung.

13. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur 18-25°C.

14. Schritt 3 wiederholen.

15. Setzen Sie jeder Reaktionsvertiefung 100 µl Substratlösung zu.

16. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur 18-25°C.

17. Geben Sie 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung und zwar in der Reihenfolge, in der Sie die Substratlösung zugegeben hatten.

18. Schütteln Sie die Platte gründlich und messen Sie die Extinktionswerte/ Optische Dichte (OD) der Kontrollen und Proben sofort mit einem Photometer bei 450 nm.

Abbildung 1: Plattenverteilung von Proben und Kontrollen

	1	2	3	4
A	Kontrolle A	Kontrolle A	Probe 5	Probe 5
B	Kontrolle B	Kontrolle B	Probe 6	Probe 6
C	Kontrolle B	Kontrolle B	Probe 7	Probe 7
D	Kontrolle C	Kontrolle C	Probe 8	Probe 8
E	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9
F	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10
G	Probe 3	Probe 3	etc.	etc.
H	Probe 4	Probe 4	etc.	etc.
	Zugabe von Anti-TGEV Lösung	Zugabe von Anti-TGEV/PRCV Lösung	Zugabe von Anti-TGEV Lösung	Zugabe von Anti-TGEV/PRCV Lösung

Auswertung

Hinweis: Alle Berechnungen für die monoklonalen Antikörper von TGEV und TGEV/PRCV sind separat auszuführen.

- 1. Berechnen Sie den Mittelwert der optischen Dichte (OD) für jede der Kontrollseren und Proben.
- 2. Berechnen Sie die Werte in Prozent der Inhibition (PI, percent inhibition) für die positiven Kontrollseren sowie die Proben. Verwenden Sie dazu die folgende Formel:

PI = $\frac{OD_{Neg. Kontrolle} - OD_{Probe oder Pos. Kontrolle}}{OD_{Neg. Kontrolle}}$ X100

Interpretation der Ergebnisse
Richtwerte zur Überprüfung der korrekten Testdurchführung

Um die Testgültigkeit sicherzustellen, sollte das negative TGEV/PRCV-Kontrollserum einen höheren OD-Wert als 0,5 aufweisen. Für die Kontrollseren A und C gelten folgende PI-Werte:

% Inhibition (PI)		
	Anti-TGEV	Anti TGEV/PRCV
A	> 60	> 60
C	< 15	> 60

Interpretation

PI	> 60	positive	(+)
PI	45-60	fraglich	(+/-)
PI	< 45	negative	(-)

Die Serumproben mit fraglichen PI-Werten sind als ergebnislos (+/-) einzustufen. Die Analyse ist zu wiederholen. Wird weiterhin kein eindeutiges Ergebnis erzielt, ist mit einem Abstand von mindestens 3 Wochen eine neue Probe zu testen.

Anti-TGEV	Anti-TGEV/PRCV	Interpretation
-	-	Negativ für TGEV und PRCV
-	+	Positiv für PRCV (negativ für TGEV)
+	+	Positive für TGEV
+/-	-	Ungültige Testergebnisse*
+	-	Ungültige Testergebnisse*
+	+/-	Ungültige Testergebnisse**
+/-	+	Nicht zu beurteilen betr. TGEV
-	+/-	Nicht zu beurteilen betr. PRCV
+/-	+/-	Ergebnislos für TGEV und PRCV

* Einige Seren von Tieren mit hohen Antikörpertitern gegenüber PRCV können eine negative Reaktion beim Blocking-ELISA zeigen. Diese Seren werden beim Titrieren oder Testen in hohen Verdünnungen positiv ausfallen ("Prozonenphänomen").

** Ungültiges Testergebnis. Entweder liegt das "Prozonenphänomen" (siehe *) oder ein technischer Fehler bei der Testdurchführung vor.

Ergebnisse aus einer kanadischen Studie (aufHerdenbasis)

Referenz	Probengröße (Anzahl von Herden) ¹ , Kit/Refenz ²				Art von Proben	Relative Sensitivität und Spezifität (95% Konfidenzintervall)
	+/+	-/+	+/-	-/-		
J. Vet. Diag. Invest. (2002) 14:97-105 ⁹	28	2	4	66	Serum	Sensitivität: 93,3% (77,9%, 99,2%) Spezifität: 94,3% (86%, 98,4%)

- 1. Bekannter serologischer Status
- 2. Klinische Symptome

Referenzen

1. Saif, L. J. and Bohl, E. H. (1986) Transmissible Gastroenteritis. In Diseases of Swine 6th Edition. Edited by A.D. Leman, R.D. Glock, W. C. Mengeling, R.H. Penny, E. Scholl, and B. Straw. Iowa State Uni. Press, Ames, Iowa U.S.A. pp. 255-274.
2. Furuuuchi, S., Shimizu, Y., and Kumagai, T. (1978/1979) Multiplication of low and high cell culture passaged strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn piglets. Vet. Microb. 3, 169-178.
3. Kemeny, L. J., Wiltsey, V. L., and Riley, J. L. (1975) Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected pig-lets. Cornell Vet. 65, 352-362.
4. van Nieuwstadt, A. P. and Pol, J. M. A. (1989) Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. Vet. Rec. 124, 43-44.
5. Brown, I. and Cartwright, S. F. (1986) New porcine coronavirus? Vet. Rec. 119, p. 282.
6. Pensaert, M., Callebaut, P. and Vergote, J. (1986) Isolation of a porcine respiratory non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. The Veterinary Quarterly. 8, 257-260.
7. Garwes, D. J., Stewart, F., Cartwright, S. F. and Brown, I. (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. Vet. Rec. 122, 86-87.
8. Callebaut, P. *et al.* (1988). Antigenic differentiation between TGEV of swine and a related porcine respiratory coronavirus. J. Gen. Virol.
9. Carman, S. *et al.* (2002). Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. J. Vet. Diagn. Inves.t 14:97-105.



Hergestellt von SVANOVA
Verteil 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 10-7500-02
Microplacas Microplacas (96 pocillos) recubiertas con antígeno de TGEV no infeccioso (selladas y almacenadas en seco)	2 (Tiras) 12 x 8
Conjugado Concentrado (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos anti-IgG de ratón)	1 x 30 µl
Solución PBS-Tween 20x concentrado	1 x 125 ml
Tampón para dilución de conjugado - Contiene conservante	1 x 25 ml
Solución sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de sustrato con H ₂ O ₂) - ALMACENAR EN OSCURO	1 x 20 ml
Solución frenadora Contiene ácido sulfúrico (2M) - CORROSIVO	1 x 10 ml
Solución de AcM anti-TGEV - Contiene 0,07% ProClin	1 x 10 ml
Solución de AcM anti-TGEV/PRCV - Contiene 0,07% ProClin	1 x 10 ml
A. Suero control positivo TGEV - Contiene 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml
B. Suero control negativo TGEV/PRCV - Contiene 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml
C. Suero control positivo PRCV - Contiene 0,07% ProClin	1 x 2,5 ml

Manual de kit SVANOVIR® TGEV/
PRCV-Ab: N° artículo: 10-7500-02

Análisis Diferencial entre el Virus de la Gastroenteritis Transmisible Porcina y el Coronavirus Respiratorio Porcino

Nombre y aplicación

Kit de ELISA SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab es un kit diseñado para diferenciar anticuerpos específicos de TGEV y PRCV en sueros porcinos. Se pueden muestrear un máximo de 88 sueros (excluidos los pocillos para los controles).

Información general

La gastroenteritis transmisible (TGE) es una enfermedad viral del cerdo muy contagiosa que se caracteriza por vómitos, diarrea líquida, anorexia y deshidratación. La mortalidad es elevada en los lechones más jóvenes. Los lechones mayores de 3 semanas suelen sobrevivir a la enfermedad. Los signos clínicos en cerdos adultos se limitan a pérdida de apetito y diarrea. La enfermedad la causa el coronavirus TGEV (virus de la gastroenteritis transmisible porcina). El TGEV ingerido se replica principalmente en las células epiteliales del intestino delgado¹. La leche y las heces de los animales portadores son las principales fuentes de transmisión del virus. Algunos pájaros y moscas domésticas pueden actuar como vectores mecánicos del virus. El coronavirus respiratorio porcino (PRCV) está relacionado antigenicamente con TGEV pero ese se replica principalmente en las amígdalas y tracto respiratorio^{2,3}. El PRCV puede causar neumonías⁴. Normalmente, el PRCV produce solo leves síntomas respiratorios clínicos, y a veces ningunos^{5,6}. Debido a que TGEV y PRCV tienen receptores antigénicos similares^{7,8} o debido a problemas con animales portadores, es muy importante diferenciar estos dos virus mediante una prueba diagnóstica de rutina.

Principio

El kit de ELISA para diferenciar la gastroenteritis transmisible porcina/coronavirus respiratorio porcino está diseñado para diferenciar anticuerpos de TGEV y PRCV en suero sanguíneo. El procedimiento del kit se basa en un inmunoensayo enzimático de bloqueo (blocking-ELISA).

Mediante este procedimiento, las muestras se exponen al antígeno no infeccioso de TGEV fijados en microplacas/tiras.

Si en la muestra existen anticuerpos contra-TGEV o contra-PRCV estos se fijarán a los antígenos virales en los pocillos y bloquearán los receptores antigénicos. Si no hay anticuerpos anti TGEV o anti-PRCV, los receptores quedarán libres. Cuando se añadan anticuerpos monoclonales contra-TGEV o contra-TGEV/PRCV estos se unirán a receptores libres y específicos del virus. Al añadir anticuerpos contra-Ig de ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) estos se fijarán a los anticuerpos monoclonales presentes en los pocillos. Cuando se añade el sustrato, se desarrolla un color azul. El resultado negativo se indica mediante un cambio de color fuerte. La reacción se detiene al añadir la solución frenadora y el color cambia a amarillo. La densidad óptica (DO) se mide a 450 nm mediante un fotómetro para microplacas y se calcula el porcentaje de inhibición de los controles positivos (A, C) y las muestras en relación con el control negativo (B).

Materialales 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. Recipientes:
 - 1-2 litros para solución PBS-Tween
 - 20 ml para la solución conjugado
6. Fotómetro para microplacas, filtro de 450 nm

Información de las muestras

Para cada muestra se requieren 2 x 50 µl de suero sanguíneo no diluido. Cada muestra requiere el uso de dos pocillos de la microplaca. Se pueden utilizar muestras de suero recientes, refrigeradas o congeladas.

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.

Solución de conjugado HRP:

Diluir el conjugado concentrado de HRP en la solución de dilución del conjugado de acuerdo al factor de dilución (f) dado en el tubo original que contiene el conjugado. Prepárelo inmediatamente antes de su uso y mezclarlo bien en un agitador. Prepare 10 ml para una placa de 96 pocillos o 1 ml para cada tira de 8 pocillos. Deseche el sobrante de la solución.

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 (3 controles) 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

El volumen de los reactivos es suficiente para realizar al menos 10 pruebas distintas. Las tiras con sellado abierto pueden almacenarse a una temperatura de 2-8°C hasta 4 semanas.

Procedimiento

1. Antes de su empleo los reactivos deben dejarse que alcancen una temperatura ambiente 18-25°C. Marcar cada tira con un número.

2. Enjuagar las placas/tiras 3 veces con la solución PBS-Tween:llene completamente los pocillos cada vez que enjuague, deje la placa con el amortiguador 1 minuto, vacíe y dé unos golpes a las placas para eliminar cualquier resto de líquido.

3. Añadir 100 µl de suero control positivo (A y C) y 100 µl de suero control negativo (B) a los pocillos seleccionados. Se recomienda correr los controles de suero por duplicado (ver figura 1).

4. Añadir 50 µl de solución PBS-Tween y 50 µl de muestra de suero no diluido a los pocillos seleccionados. Añadir muestra en duplicados.

5. Mezclar el contenido de los pocillos minuciosamente dándole golpecitos en los lados de la placa. Sellar la placa/tira e incubar a 37°C durante 2 horas.

6. Repetir el paso #2.

7. Añadir 100 µl de solución anti-VGET a uno de los pocillos de la muestra y 100 µl de solución anti-TGEV/PRCV al otro pocillo de la muestra. Repetir este paso para cada par de controles y muestras (ver figura 1).
8. Sellar la placa/tiras e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, 18-25°C.

9. Repetir el paso #2.

10. Añadir 100 µl de solución conjugado de HRP a cada pocillo, sellar las placas/tiras e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, 18-25°C.

11. Repetir el paso #2.

12. Añadir 100 µl de la solución sustrato a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, 18-25°C. Comience a cronometrar al llenar el primer pocillo.

13. Interrumpir la reacción añadiendo 50 µl de solución frenadora a cada pocillo y mezcle bien el contenido de los pocillos. Añadir la solución frenadora en el mismo orden en que lo llenó con solución sustrato en el paso #12.

14. Medir la densidad óptica (DO) de los controles y las muestras a 450 nm con un fotómetro para microplacas (aire como muestra en blanco).

Medir la DO en el intervalo de 15 minutos tras haber añadido la solución frenadora para evitar fluctuaciones en los valores de DO.

Figura 1. Tabla de procedimiento recomendado para la adición de controles y muestras

	1	2	3	4
A	Control A	Control A	Muestra 5	Muestra 5
B	Control B	Control B	Muestra 6	Muestra 6
C	Control B	Control B	Muestra 7	Muestra 7
D	Control C	Control C	Muestra 8	Muestra 8
E	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 9	Muestra 9
F	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 10	Muestra 10
G	Muestra 3	Muestra 3	etc.	etc.
H	Muestra 4	Muestra 4	etc.	etc.
	Sol. anti-TGEV	Sol. anti-TGEV/ PRCV	Sol. anti-TGEV	Sol. anti-TGEV/ PRCV

Cálculos

Nota: deben realizarse los cálculos de las soluciones TGEV y TGEV/PRCV mAb por separado.

- 1. Calcular el valor de la densidad óptica (DO) media para cada controles y muestras.
- 2. Calcular los valores de porcentaje de inhibición (PI) de los controles positivos y de muestras según la siguiente fórmula:

PI = $\frac{DO_{Ctrl. neg.} - DO_{Muestras o Ctrl. pos.}}{DO_{Control negativo}} \times 100$

Interpretación de resultados

Criterios de validéz de la prueba

Para garantizar la validéz de la prueba, el suero control negativo TGEV/PRCV (B) debe tener un valor OD superior a 0,5 y los sueros de control A y C de la siguiente forma:

% de inhibición (PI)		
	Anti-TGEV	Anti TGEV/PRCV
A	> 60	> 60
C	< 15	> 60

Interpretación

PI	> 60	positivo	(+)
PI	45-60	dudoso	(+/-)
PI	< 45	negativo	(-)

Las muestras de suero con valores de PI en la zona de duda (+/-) deben interpretarse como inconcluyentes o inválidos y debe repetirse la prueba. Si el resultado fuera de nuevo inconcluyente o inválido, deberá realizarse una prueba con una muestra nueva por lo menos 3 semanas después.

Anti-TGEV	Anti-TGEV/PRCV	Interpretación
-	-	Negativo para TGEV y PRCV
-	+	Positivo para PRCV (negativo para TGEV)
+	+	Positivo para PRCV
+/-	-	Resultado no válido*
+	-	Resultado no válido*
+	+/-	Resultado no válido**
+/-	+	Inconcluyente para TGEV
-	+/-	Inconcluyente para PRCV
+/-	+/-	Inconcluyente para TGEV y PRCV

* Algunas muestras de suero con altos niveles de anticuerpos anti-PRCV pueden presentar una reacción negativa en el ELISA de bloqueo debido al fenómeno "prozona". Estos sueros darán resultados positivos si la prueba se realiza con mayor volumen de dilución (por ejemplo 1/250 o 1/500).

**Resultado de la prueba inválido debido al fenómeno "prozona" (ver *), o error técnico al realizar la prueba.

Datos de un estudio canadiense (en pjaras)

Estudio Referencia	Tamaño de la muestra (nº de pjaras) ¹ , Kit/Referencia ²				Tipo de muestra	Sensibilidad y especificidad relativa (Intervalo de confiabilidad del 95%)
	+/+	-/+	+/-	-/-		
J. Vet. Diag. Invest. (2002) 14:97-105 ⁹	28	2	4	66	Suero	Sensibiliad: 93.3 (77.9%, 99.2%) Specificity: 94.3% (86%, 98.4%)

1. Estado serológico conocido

2. Signos clínicos

Referencias

1. Saif, L. J. and Bohl, E. H. (1986) Transmissible Gastroenteritis. In Diseases of Swine 6th Edition. Edited by A.D. Leman, R.D. Glock, W. C. Mengeling, R.H. Penny, E. Scholl, and B. Straw. Iowa State Uni. Press, Ames, Iowa U.S.A. pp. 255-274.
2. Furuuuchi, S., Shimizu, Y., and Kumagai, T. (1978/1979) Multiplication of low and high cell culture passaged strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn piglets. Vet. Microb. 3, 169-178.
3. Kemeny, L. J., Wiltsey, V. L., and Riley, J. L. (1975) Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected pig-lets. Cornell Vet. 65, 352-362.
4. van Nieuwstadt, A. P. and Pol, J. M. A. (1989) Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. Vet. Rec. 124, 43-44.
5. Brown, I. and Cartwright, S. F. (1986) New porcine coronavirus? Vet. Rec. 119, p. 282.
6. Pensaert, M., Callebaut, P. and Vergote, J. (1986) Isolation of a porcine respiratory non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. The Veterinary Quarterly. 8, 257-260.
7. Garwes, D. J., Stewart, F., Cartwright, S. F. and Brown, I. (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. Vet. Rec. 122, 86-87.
8. Callebaut, P. *et al.* (1988). Antigenic differentiation between TGEV of swine and a related porcine respiratory coronavirus. J. Gen. Virol.
9. Carman, S. *et al.* (2002). Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. J. Vet. Diagn. Inves. 14:97-105.



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 10-7500-02
Microplaques Microplaques (96 puits) sensibilisés avec l'antigène non infectieux de VGET (scellées et gardées au sec)	2 (Barrettes) 12 x 8
Conjugué Concentré (peroxydase de raifort conjugué à des IgG anti-souris)	1 x 30 µL
Solution de PBSTween Concentrée 20 fois	1 x 125 mL
Tampon de dilution du conjugué - Contient des agents conservateurs	1 x 25 mL
Solution de substrat (Tétraméthylbenzidine dans le tampon de substrat contenant H ₂ O ₂) - CONSERVER À L'OBSCURITÉ!	1 x 20 mL
Solution d'arrêt Contient de l'acide sulfurique (2M) - CORROSIF!	1 x 10 mL
Solution d'AcM anti-VGET - Contient 0,07% ProClin	1 x 10 mL
Solution d'AcM anti-VGET/CVRP - Contient 0,07% ProClin	1 x 10 mL
A. Sérum de contrôle positif VGET - Contient 0,07% ProClin	1 x 2,5 mL
B. Sérum de contrôle négatif VGET/CVRP - Contient 0,07% ProClin	1 x 2,5 mL
C. Sérum de contrôle positif CVRP - Contient 0,07% ProClin	1 x 2,5 mL

Ce manuel concerne la trousse
SVANOVIR TGEV/PRCV-Ab:
N° d'article 10-7500-02

Test de différenciation entre le virus de la gastro-entérite transmissible et le coronavirus respiratoire porcin

Nom et application

La trousse de diagnostic SVANOVIR® TGEV/PRCV-Ab est une épreuve immunoenzymatique (ELISA) conçue pour différencier les anticorps spécifiques anti-VGET et anti-CVRP détectés dans le sérum de porc. Un maximum de 88 sérums porcins peuvent être testés avec la trousse.

Information générale

La gastro-entérite transmissible du porc (GET) est une maladie infectieuse virale hautement contagieuse caractérisée par des vomissements, une diarrhée liquide, une anorexie et une déshydratation. Le taux de mortalité est élevé chez les jeunes porcelets. Les porcelets à la mamelle âgés de plus de 3 semaines survivent généralement à l'infection. Chez le porc adulte, les signes cliniques se limitent à une perte d'appétit et à une diarrhée. L'infection est due au coronavirus porcin de la GET. Après ingestion, le virus GET (VGET) se réplique essentiellement dans les cellules épithéliales villosités de l'intestin grêle¹. La contamination se fait principalement à partir du lait et des selles d'animaux porteurs du virus, les étourneaux et les mouches pouvant servir de vecteurs mécaniques. Le coronavirus respiratoire porcin (CVRP) est antigéniquement apparenté au VGET, mais il se multiplie surtout dans les amygdales et le tractus respiratoire^{2,3}. Le CVRP peut être responsable de pneumonie chez le porc⁴, mais ne provoque généralement que des symptômes respiratoires bénins ou aucun signe clinique^{5,6}. La présence de nombreux sites antigéniques similaires sur la surface des deux virus^{7,8} et la difficulté d'identifier les animaux porteurs sains rendent essentielle une différenciation claire entre ces deux virus par un test adapté au diagnostic de routine.

Principe

La trousse ELISA de différenciation entre le virus de la gastro-entérite transmissible et le coronavirus respiratoire porcin est destinée à distinguer les anticorps anti-VGET de ceux anti-CVRP dans le sérum. Le test utilise la technique ELISA de blocage. Les échantillons sont mis en contact avec des antigènes non-infectieux du VGET couplés à des puits de barrettes. Si des anticorps anti-VGET ou anti-CVRP sont présents dans l'échantillon à tester, ils se fixeront aux antigènes du virus dans le puits et bloqueront ces sites antigéniques. En l'absence d'anticorps anti-VGET ou anti-CVRP dans l'échantillon, ces sites resteront libres. Lorsqu'on ajoute des anticorps monoclonaux (AcM) anti-VGET ou anti-VGET/CVRP, ils se lient aux sites libres spécifiques du virus. En ajoutant des anticorps (IgG) anti-souris conjugués à la peroxydase de raifort (HRP), ceux-ci se fixent aux AcM présents dans le puits. L'ajout du substrat chromogène provoque le développement d'une couleur bleue. Un résultat négatif est indiqué par une coloration intense. La réaction est arrêtée par addition d'une solution d'arrêt : la solution vire au jaune. La densité optique (DO) est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques et le pourcentage d'inhibition des contrôles positifs (A, C) et des échantillons par rapport au contrôle négatif (B) est calculé.

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. Récipients :
1 à 2 litres pour PBS-Tween
20 mL pour le conjugué
6. Photomètre à microplaques (filtre de 450 nm)

Information sur les échantillons

2 x 50 µL de sérum non dilué sont nécessaires pour chaque échantillon. On utilisera deux puits par échantillon à tester. On peut utiliser du sérum frais, réfrigéré ou congelé.

Préparation des réactifs

Tampon de 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.

Conjugué enzymatique HRP:

Diluer le conjugué enzymatique dans le tampon de dilution selon de facteur de dilution (f) indiqué sur l'étiquette du flacon immédiatement avant utilisation et bien mélanger sur un agitateur. En préparer 10 mL pour une plaque de 96 puits ou 1 mL pour chaque barrette de 8 puits. Jeter ensuite les résidus de solution non utilisés.

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 (3 contrôles) sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, désionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Lors de la préparation des tampons etc., mesurer le volume requis.
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!

Le volume des réactifs est suffisant pour effectuer des analyses 10 fois.

Une fois leur emballage ouvert, les barrettes peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines à 2-8°C

Protocole

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante,18-25°C avant usage. Numéroter toutes les barrettes.

2. Rincer chaque plaque/barrettes 3 fois avec le tampon de PBS-Tween: Remplir les puits à chaque lavage, rincer la plaque avec le tampon pendant 1 minute, les vider de leur contenu et tapoter fermement la plaque retournée pour faire tomber les gouttes de liquide restantes.

3. Ajouter 100 µL de sérum de contrôle positif (A et C) et 100 µL de sérum de contrôle négatif (B) dans les puits préalablement identifiés. Il est recommandé d’inclure les sérums de contrôle en double - voir figure 1.

4. Ajouter 50 µL de PBS-Tween et 50 µL de chaque échantillon de sérum non dilué dans les puits appropriés. Ajouter les échantillons en double.

5. Bien agiter en tapant sur le côté de la microplaque. Sceller la plaque/barrettes et incubé à 37°C pendant 2 heures.

6. Répéter l’étape 2.

7. Ajouter 100 µL de solution anti-VGET à l’un des puits des échantillons testés et 100 µL de solution anti-VGET/CVRP à l’autre puits. Répéter cette étape pour chaque paire de contrôles et d’échantillons (voir figure 1).
8. Incuber 30 minutes à la température ambiante, entre18-25°C.

9. Répéter l’étape 2.

10. Ajouter dans chaque puits 100 µL de solution diluée de conjugué enzymatique HRP, sceller la plaque/barrettes et incubé à la température ambiante, 18-25°C pendant 30 minutes.

11. Répéter l’étape 2.

12. Ajouter 100 µL de solution de substrat TMB dans chaque puits et incubé 30 minutes à la température ambiante. Commencer à compter une fois le premier puits rempli.

13. Arrêter la réaction en ajoutant à chaque puits 50 µL de solution d’arrêt, en procédant dans le même ordre que pour l’ajout du substrat (étape 12). Bien agiter la plaque.

14. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm à l’aide d’un lecteur de microplaques (pour le blanc du lecteur, laisser un puits vide). Afin d’éviter des variations de DO, effectuer ces lectures dans les 15 minutes qui suivent l’ajout de la solution d’arrêt.

Figure 1: schéma de procédé recommandé pour l’addition des contrôles et des échantillons

	1	2	3	4
A	Contrôle A	Contrôle A	Échantillon 5	Échantillon 5
B	Contrôle B	Contrôle B	Échantillon 6	Échantillon 6
C	Contrôle B	Contrôle B	Échantillon 7	Échantillon 7
D	Contrôle C	Contrôle C	Échantillon 8	Échantillon 8
E	Échantillon 1	Échantillon 1	Échantillon 9	Échantillon 9
F	Échantillon 2	Échantillon 2	Échantillon 10	Échantillon 10
G	Échantillon 3	Échantillon 3	etc.	etc.
H	Échantillon 4	Échantillon 4	etc.	etc.
	Sol. anti-VGET	Sol. anti-VGET/ CVRP	Sol. anti-VGET	Sol. anti-VGET/ CVRP

Calculs

N.B. Tous les calculs doivent être effectués séparément pour les anticorps monoclonaux anti-VGET et anti-VGET/CVRP

- 1. Calculer la valeur de la densité optique moyenne (DO) pour chacun des contrôles et des échantillons.
- 2. Calculer les valeurs de pourcentage d'inhibition (PI) pour les contrôles positifs et pour les échantillons en utilisant la formule suivante:

PI = $\frac{DO_{\text{cont. nég.}} - DO_{\text{échantillon ou cont. pos.}}}{DO_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$

Interprétation des résultats

Critères de validité du test

Pour assurer la validité du test, le sérum de contrôle négatif VGET/CVRP (B) doit avoir une DO supérieure à 0,5 et les sérums de contrôle A et C comme indiqué ci-dessous.

% d'inhibition (PI)		
	Anti-VGET	Anti VGET/CVRP
A	> 60	> 60
C	< 15	> 60

Interprétation

PI	> 60	positif	(+)
PI	45-60	douteux	(+/-)
PI	< 45	negatif	(-)

Les sérums avec au moins un PI douteux (+/-) doivent être interprétés comme peu concluants ou non valables et le test doit être répété. Si le test reste peu concluant ou non valable, un nouvel échantillon doit être testé après un intervalle d'au moins 3 semaines.

Anti-VGET	Anti-VGET/CVRP	Interprétation du test
-	-	Négatif pour VGET et CVRP
-	+	Positif pour CVRP (négatif pour VGET)
+	+	Positif pour VGET
+/-	-	Résultat de test non valable*
+	-	Résultat de test non valable*
+	+/-	Résultat de test non valable**
+/-	+	Peu concluant pour VGET
-	+/-	Peu concluant pour CVRP
+/-	+/-	Peu concluant pour VGET et CVRP

* Certains sérums avec un niveau élevé d'anticorps anti-CVRP peuvent présenter une réaction négative dans l'ELISA de blocage dû au phénomène de prozone. Ces sérums deviendront positifs si testés à une dilution plus élevée (par exemple 1/250 ou 1/500).

**Résultat du test non valable dû soit au phénomène de prozone (voir*), soit à une erreur technique durant le test.

Les données d'une étude canadienne (selon les troupeaux)

Référence de l'étude	Taille de l'échantillon (Nbre des troupeaux) ¹ , Trousse/Référence ²				Type de l'échantillon	Sensibilité et spécificité relatives (Intervalle de confiance à 95%)
	+/+	-/+	+/-	-/-		
J. Vet. Diag. Invest. (2002) 14:97-105 ⁹	28	2	4	66	Suero	Sensibilité: 93.3 (77.9%, 99.2%) Spécificité: 94.3% (86%, 98.4%)

1. Statut sérologique connu

2. Signes cliniques

Bibliographie

1. Saif, L. J. and Bohl, E. H. (1986) Transmissible Gastroenteritis. In Diseases of Swine 6th Edition. Edited by A.D. Leman, R.D. Glock, W. C. Mengeling, R.H. Penny, E. Scholl, and B. Straw. Iowa State Uni. Press, Ames, Iowa U.S.A. pp. 255-274.
2. Furuuchi, S., Shimizu, Y., and Kumagai, T. (1978/1979) Multiplication of low and high cell culture passaged strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn piglets. Vet. Microb. 3, 169-178.
3. Kemeny, L. J., Wiltsey, V. L., and Riley, J. L. (1975) Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected pig-lets. Cornell Vet. 65, 352-362.
4. van Nieuwstadt, A. P. and Pol, J. M. A. (1989) Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. Vet. Rec. 124, 43-44.
5. Brown, I. and Cartwright, S. F. (1986) New porcine coronavirus? Vet. Rec. 119, p. 282.
6. Pensaert, M., Callebaut, P. and Vergote, J. (1986) Isolation of a porcine respiratory non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. The Veterinary Quarterly. 8, 257-260.
7. Garwes, D. J., Stewart, F., Cartwright, S. F. and Brown, I. (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. Vet. Rec. 122, 86-87.
8. Callebaut, P. *et al.* (1988). Antigenic differentiation between TGEV of swine and a related porcine respiratory coronavirus. J. Gen. Virol.
9. Carman, S. *et al.* (2002). Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. J. Vet. Diagn. Inves.t 14:97-105.



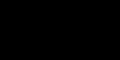
Kit fabriqué par SVANOVA
Kit distribué par BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE
+33 (0) 4 26 78 47 60



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