

PrioCHECK™ Rum. BVD p80 Ab Serum & Milk Kit

Immuno-enzymatische test voor het specifiek aantonen van BVD/BD p80-antilichamen in serum en melk van herkauwers.

Catalogusnummer BVDIL5

Pub. nr. MAN0016950 Rev. A.0

Technologie	Soort	Monstermatrix	Bemonsteringstest	Protocol ⁽¹⁾
Blocking monowell ELISA - stripplaten	Runderen	Serum	Individueel	KI, LI
			Gepoold	LI
		Melk	Individueel	LI
			Tank	
	Kleine herkauwers	Serum	Individueel	KI, LI
			Gepoold	LI

⁽¹⁾ KI: korte incubatie; LI: lange incubatie

WAARSCHUWING! Lees de veiligheidsinformatiebladen (SDS-en) en volg de behandelingsinstructies. Draag geschikte oogbescherming, beschermende kleding en handschoenen. Veiligheidsinformatiebladen (SDS-en) zijn beschikbaar op thermofisher.com/support.

WAARSCHUWING! MOGELIJK BIOLOGISCH RISICO. Lees de veiligheidsinformatie over biologische risico's op de pagina van het product op thermofisher.com. Draag geschikte oogbescherming, beschermende kleding en handschoenen.

Algemene informatie

Het bovine virusdiarree-virus (BVDV) is een virus dat tot het genus *Pestivirus* van de familie van flavivirussen behoort. Er zijn twee andere dierlijke virussen die tot hetzelfde *Pestivirus*-genus behoren: het Border Disease Virus (BDV) bij kleine herkauwers en de klassieke varkenspest (CSF) bij varkens.

BVDV is een van de meest wijdverspreide pathogene virussen bij vee, en veroorzaakt wereldwijd aanzienlijke verliezen in de melk- en vleesindustrie. Het virus kan de placenta van geïnfecteerde drachtige koeien passeren, wat kan leiden tot voortplantingsverliezen in de vorm van arbotus, doodgeboren kalveren en kalveren die te vroeg sterven. Sommige kalveren die het overleven worden immunotolerant voor het virus. Deze dieren blijven de rest van hun leven grote hoeveelheden infectueus virus uitscheiden. Het is belangrijk om deze dragers te identificeren om de infectiecyclus in de kudde te doorbreken. Draggers overlijden vaak aan slijmvliesziekte (mucosal disease; MD) in hun eerste twee levensjaren.

De diagnose van BVDV door middel van het aantonen van specifieke antilichamen heeft verschillende toepassingen:

- Aantonen van de verspreiding van het virus binnen de veestapel
- Vroegtijdig opsporen van immunotolerante, permanent geïnfecteerde dieren (PI)
- Het bewaken van de kudde na verwijdering van de PI
- Het uitvoeren van epidemiologische onderzoeken

De Applied Biosystems™ PrioCHECK™ Rum. BVD p80 Ab Serum & Milk Kit kan bij de volgende monsters worden gebruikt:

- Individuele en gepoolde sera van runderen en kleine herkauwers om anti-BVDV- en anti-BDV-antilichamen aan te tonen.
- Individuele en tankmelk van runderen om anti-BVDV-antilichamen aan te tonen.

Testprincipe

De test is gebaseerd op het principe van een blocking ELISA (competitieve binding).

1. De monsters en controles worden over de met BVD/BD-antigen (Ag) gecoate microtiterplaat verdeeld. Alle specifieke BVD/BD-antilichamen in het monster binden zich aan het Ag.
2. Na het wassen, wordt er een conjugaat (anti-p80 monoonaal antilichaam) gelabeld met peroxidase (HRP) toegevoegd, dat zich bindt aan het vrije p80 antigeen op de plaat.
3. Ongebonden conjugaat wordt door wassen verwijderd, gevolgd door toevoeging van chromogeenisch substraat. Bij oxidatie van het substraat door het HRP-conjugaat krijgt het een blauwe kleur.
4. Nadat de reactie is gestopt, krijgt het een gele kleur. De resultaten kunnen worden afgelezen met behulp van een ELISA-plaatlezer.

Positieve monsters veroorzaken een relatief zwakke tot geen kleur.

Inhoud en opslag van de kit

Onderdeel	Beschrijving	Aantal (480 testen)	Opslag
1 - Coated microplate BVD	BVD-gecoate microtiterplaat, 12 strips van 8 wetletjes	5 eenheden	5 ± 3 °C ⁽¹⁾
2a - Serum Negative C. BVD	BVD negatieve controle (NC) voor serum	1 ml	5 ± 3 °C
2b - Milk Negative C. BVD	BVD negatieve controle (NC) voor melk	2 ml	
3a - Serum Positive C. BVD	BVD positieve controle (PC) voor serum	1 ml	
3b - Milk Positive C. BVD	BVD positieve controle (PC) voor melk	2 ml	
4 - Conjugate BVD	Anti-p80 HRP-conjugaat BVD (roze)	60 ml	
A - Wash (10x)	Wasoplossing, 10X-concentraat	250 ml	
B - Sample DB BVD	BVD-monsterverduunningsbuffer (groen)	60 ml	
C - Substrate	Substraat-oplossing	60 ml	
D - Stop	Stop-oplossing	60 ml	
Zelfklevende afdekfolie (plate sealer)		10	KT ⁽²⁾

⁽¹⁾ Ongebruikte strips kunnen tot de uiterste gebruiksdatum van de kit met het droogmiddel (inbegrepen in de kit) in de verzegelde zak worden opgeslagen bij 5 ± 3 °C.

⁽²⁾ Kamertemperatuur

Benodigde, maar niet inbegrepen materialen

Alle materialen zijn verkrijgbaar via thermofisher.com, tenzij anders aangegeven.

Enkel- en meerkanaals micropipetten	Wegwerp-pipettips
Gedistilleerd of gedeïoniseerd water	Microplaat-incubator (37 ± 2 °C)
ELISA-plaatlezer, voorzien van een 450 nm-filter of 450 en 620 nm-filters	Wegwerpbakjes (reagentreservoirs)

Belangrijke richtlijnen voor de procedure

- Reagentia van verschillende kit batches mogen niet door elkaar gebruikt worden.
- Vermijd besmetting van reagentia door gebruik te maken van bemonsteringshulpmiddelen voor eenmalig gebruik.
- Pipetteer reagentia niet met de mond.

Vorbereiding van monsters

Vers, gekoelde serum of melk (8 dagen bij 5 ± 3 °C), of bevroren serum of melk (1 jaar bij < -16 °C) kan gebruikt worden.

De melk mag, indien nodig, een conserveermiddel bevatten. Niet-bevroren melk verdient de voorkeur.

De monsters dienen van tevoren te worden gehomogeniseerd.

- **Individuele sera** en controles dienen te worden getest in een verdunding van **1:10** (korte of lange incubatie).
- **Gepoolde sera van groepen dieren van één en hetzelfde boerenbedrijf (uitsluitend lange incubatie):**
 - Voor **epidemiologisch gebruik**, met als doel de positieve prevalentie in homogene groepen dieren te evalueren (**een pool van 2 tot 20 sera**), worden de gepoolde sera en controles getest in een verdunding van **1:20**.
 - Voor **diagnostisch gebruik**, met als doel ten minste één seropositief dier in **een pool van 2 tot 10 sera** aan te tonen, worden de gepoolde sera en controles getest in een verdunding van **1:2**.
- **Individuele en tankmelk** en controles worden getest in een **verdunding van 1:2 in wasoplossing (uitsluitend lange incubatie)**.

OPMERKING: het gebruik van een intern controlemonster wordt sterk aanbevolen voor elke testreeks. Er zijn interne referenties beschikbaar (Cat. nr. RBVD voor serum of BVDSET voor melk).

Vorbereiding van reagentia

- De reagentia **1 - Coated microplate BVD**, **B - Sample DB BVD**, **4 - Conjugate BVD**, **C - Substrate** en **D - Stop** zijn klaar voor gebruik.
- De reagentia **2a - Serum Negative C. BVD**, **2b - Milk Negative C. BVD**, **3a - Serum Positive C. BVD** en **3b - Milk Positive C. BVD** worden getest als monsters.
- **A - Wash (10x)**-oplossing moet worden verdund naar **1:10 in gedistilleerd/gedeïoniseerd water**.

Voorbeeld: voor één strip: 2 ml **A - Wash (10x)**-oplossing in 18 ml water; voor één plaat: 25 ml

A - Wash (10x)-oplossing in 225 ml water.

Mengen na verdunnen. De **verdunde wasoplossing** kan 1 maand worden bewaard bij 5 ± 3 °C.

OPMERKING: vanwege de hoge zoutconcentratie kan er kristalvorming optreden in de **A - Wash (10x)**-oplossing. Schud de fles voordat u begint met de verdunding, om kristallen op te lossen.

De ELISA-test uitvoeren

OPMERKING: breng de reagentia op kamertemperatuur (21 ± 4 °C) voordat u de test uitvoert. Het tolerantiebereik voor de incubatietijd is $\pm 10\%$. Voor het pipetteren van de componenten wordt het gebruik van wegwerpbakjes (reagentreservoirs) aanbevolen.

1. Pipetteren van controles en monsters

A. Individuele serummonsters (verdund naar 1:10)

- Voeg **10 µl** reagens **3a - Serum Positive C. BVD** toe aan welletjes A1 en B1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **10 µl** reagens **2a - Serum Negative C. BVD** toe aan welletjes C1 en D1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **10 µl serum voor analyse** toe aan de overige welletjes.
- Voeg **90 µl** reagens **B - Sample DB BVD** toe aan elk welletje dat de controles of monsters bevat.

B1. Gepoolde serummonsters - Epidemiologisch gebruik (verdund naar 1:20)

- Voeg **5 µl** reagens **3a - Serum Positive C. BVD** toe aan welletjes A1 en B1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **5 µl** reagens **2a - Serum Negative C. BVD** toe aan welletjes C1 en D1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **5 µl serummengsel voor analyse** toe aan de overige welletjes.
- Voeg **95 µl** reagens **B - Sample DB BVD** toe aan elk welletje dat de controles of monsters bevat.

B2. Gepoolde serummonsters - Diagnostisch gebruik (verdund naar 1:2)

- Voeg **50 µl** reagens **3a - Serum Positive C. BVD** toe aan welletjes A1 en B1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **50 µl** reagens **2a - Serum Negative C. BVD** toe aan welletjes C1 en D1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **50 µl serummengsel voor analyse** toe aan de overige welletjes.
- Voeg **50 µl** reagens **B - Sample DB BVD** toe aan elk welletje dat de controles of monsters bevat.

C. Individuele of tankmelk-monsters

- Voeg **50 µl** reagens **3b - Milk Positive C. BVD** toe aan welletjes A1 en B1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **50 µl** reagens **2b - Milk Negative C. BVD** toe aan welletjes C1 en D1 (bijvoorbeeld).
- Voeg **50 µl individuele of tankmelk** toe aan de overige welletjes.
- Voeg **50 µl reagens verdunde wasoplossing (1X)** (zie 'Voorbereiding van reagentia') toe aan elk welletje dat de controles of monsters bevat.

Schud de plaat voorzichtig en dek deze vervolgens af met een zelfklevende afdekkfolie (plate sealer).

Analyse van een individueel serum: laat de plaat overnacht incuberen (**16 tot 18 uur**) bij 5 ± 3 °C of **1 uur** bij 37 ± 2 °C.

OPMERKING: aantoonbaarheid met de kit is nauwkeuriger bij de lange incubatie.

Analyse van gepoolde sera en individuele of tankmelk: Laat de plaat overnacht incuberen (**16 tot 18 uur**) bij 5 ± 3 °C.

2. Wasstappen (4 wasbeurten)

Maak de plaat leeg en voer **4 wasbeurten** uit door **300 µl** per welletje **verdunde wasoplossing** (zie 'Voorbereiding van reagentia') toe te voegen. Leeg de plaat en klop deze op absorberend papier uit om te voorkomen dat er vloeistofresten achterblijven. Wasbeurten kunnen ofwel handmatig worden uitgevoerd of automatisch met een ELISA-plaatwasser. Laat de plaat niet in uitdrogen.

3. Pipetteren van conjugaat

Voeg **100 µl** reagens **4 - Conjugate BVD** toe aan elk welletje. Schud de plaat voorzichtig en bedek de plaat met een nieuwe zelfklevende afdekkfolie (plate sealer). Laat de plaat **1 uur** bij 37 ± 2 °C incuberen.

4. Wasstappen (4 wasbeurten)

Herhaal de bovenstaande stappen voor wassen (stap 2).

5. Testontwikkeling

Voeg **100 µl** oplossing **C - Substrate** toe aan elk welletje. Schud de plaat voorzichtig gedurende 2 seconden. Incubeer deze **10 minuten** bij op kamertemperatuur (21 ± 4 °C) in het donker. Dek de plaat niet af. Voeg **100 µl D - Stop-oplossing** in dezelfde volgorde als oplossing **C - Substrate**, toe aan elk welletje. Schud de plaat voorzichtig gedurende 2 seconden.

6. Aflezen

Droog de onderkant van de platen met een zachte doek om stof te verwijderen. Lees de plaat binnen 30 minuten na het stoppen van de reactie bij **450 nm** (monochromatisch) af of bij dubbele golflengten van 450–620 nm op een ELISA-plaatlezer.

Berekening

Bereken de gemiddelde OD (optische dichtheid) van de PC ($OD_{m PC}$) en die van de NC ($OD_{m NC}$).

Bereken voor elk monster het remmingspercentage (% Inh):

$$\% Inh = [(OD_{m NC} - OD_{monster}) / OD_{m NC}] \times 100$$

OPMERKING: bij negatieve monsters kan de % Inh < 0 zijn.

Validatie

De test is valide als:

$$\% Inh_{PC} > 60\% \text{ en } OD_{m NC} > 0,650$$

Interpretatie van de resultaten

Tabel 1 Individueel serum

Resultaten	Kwantitatieve interpretatie	Kwalitatieve interpretatie
% Inh < 50	-	Negatief
50 ≤ % Inh < 80	+	Zwak positief
% Inh ≥ 80	++	Sterk positief

Tabel 2 Pool van 2 tot 20 sera - Protocol 1:20 - Epidemiologische toepassing

Resultaten	% seroprevalentie	Interpretatie
% Inh < 65	De positieve prevalentie van p80-antilichamen is laag, normaliter < 50%.	Geen of laag risico op verspreiding van virus
% Inh ≥ 65	De positieve prevalentie van p80-antilichamen is hoog, normaliter > 50%.	Vermoedelijke verspreiding van virus. Groot risico op aanwezigheid van IPI of tijdelijk viremische dieren

Tabel 3 Pool van 2 tot 10 sera - Protocol 1:2 - Diagnostische toepassing

Resultaten	Kwalitatieve interpretatie	Status
% Inh < 30	Negatief	Niet geïnfecteerd
% Inh ≥ 30	Positief	Recentelijk geïnfecteerd of geïnfecteerd

Tabel 4 Individuele melk (rond)

Resultaten	Kwalitatieve interpretatie
% Inh < 30	Negatief
% Inh ≥ 30	Positief

Tabel 5 Tankmelk (rond)

Resultaten	Kwalitatieve interpretatie	Prevalentie van positieve dieren (P)
% Inh < 35	Negatief	P < 10%
35 ≤ % Inh < 60	Positief +	10% ≤ P < 30%
% Inh ≥ 60	Positief ++	P ≥ 30%

Documentatie en ondersteuning

Klantenservice en technische ondersteuning

Technische ondersteuning: ga naar

thermofisher.com/askaquestion

Ga naar thermofisher.com/support voor de nieuwste services en ondersteuning, waaronder:

- Wereldwijde telefoonnummers
- Orderbegeleiding en online-ondersteuning
- Gebruikershandleidingen, handleidingen en protocollen
- Analysecertificaten
- Veiligheidsinformatiebladen (SDS-en, ook bekend als MSDS-en)

OPMERKING: voor SDS-en voor reagentia en chemicaliën van andere fabrikanten neemt u contact op met de fabrikant.

Beperkte productgarantie

Life Technologies Corporation en/of zijn filialen geven garantie op hun producten volgens de

Algemene verkoopvoorwaarden van Life Technologies die op de volgende website staan:

www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. Neem bij vragen

contact op met Life Technologies via

thermofisher.com/support.



Pronics Lelystad B.V. | Platinastraat 33 |
8211 AR Lelystad | Nederland

Vertaald vanuit het Engels; Pub. nr. MAN0007794 Rev. A.0.

De informatie in deze gids kan zonder kennisgeving gewijzigd worden.

DISCLAIMER: IN DE MATE WAARIN DIT WETTELIJK IS TOEGESTAAN, ZULLEN LIFE TECHNOLOGIES EN/OF HAAR GROEPSMAATSCHAPPIJEN NIET AANSPRAKELIJK ZIJN VOOR BIJZONDERE, INCIDENTELE, INDIRECTE, PUNITIEVE, MEERVOUDIGE OF GEVOLGSCHADE DIE ONTSTAAN IN VERBAND MET OF VOORTVLOEIEN UIT DIT DOCUMENT, WAARONDER UW GEBRUIK HIERVAN.

Revisie-geschiedenis: Pub. nr. MAN0007794 (Engels)

Rev.	Datum	Beschrijving
A.0	11 augustus 2017	Bijgewerkt tot het huidige documentsjabloon, met gerelateerde updates over de garantie, handelsmerken en logo's.
1.0	8 mei 2013	Basis voor revisiegeschiedenis.

Beperkt gebruik labellicentie nr. 473: veterinaire diagnostische test. De aankoop van dit product geeft de koper het beperkte, niet-exclusieve recht het gekochte product uitsluitend te gebruiken voor veterinaire diagnostische diensten, waaronder het rapporteren van de resultaten van zulke diensten tegen een vergoeding en het verrichten van interne research uitsluitend ten gunste van de koper. Het recht tot door- en herverkoop, herverpakking of distributie van dit product of enig onderdeel daarvan is expliciet uitgesloten van de aankoop. Gelieve voor informatie over het verkrijgen van additionele rechten contact op te nemen met outlicensing@lifetech.com of Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, Californië 92008, Verenigde Staten.

©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn eigendom van Thermo Fisher Scientific en haar groepsmaatschappijen, tenzij anders staat aangeven.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

11 augustus 2017

ThermoFisher
SCIENTIFIC