

LSIVet™ Ruminant BVD/BD p80 - Serum/Milk

Enzymimmunoassay zum spezifischen Nachweis von Antikörpern gegen BVDV- und BDV-p80 im Serum und Milch von Rinder sowie Serum von Schafe

Gebrauchsinformation: Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach §17c TierSG zugelassen.

Produktreferenz DBVDIL5

Publikationsnummer MAN0007795 Version A.0

Verfahren	Tierart	Probenmaterial	Probenart	Protokoll*
Kompetitiver ELISA, Einzeltests – Streifenplatten; Protokolle mit langer und kurzer Inkubation	Rinder	Serum	Einzelproben	KI, LI
		Milch	Einzelproben	LI
	Tankmilchproben			
	Schafe	Serum	Einzelproben	KI, LI

*KI: kurze Inkubationszeit; LI: lange Inkubationszeit

Deutsche amtliche Zulassung nach § 17 c TierSG: FLI-B 603

■ Allgemeine Informationen

Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV), das Border-Disease-Virus (BDV) und das Schweinepestvirus (ESPV, CSFV) gehören dem Genus *Pestivirus* aus der Familie der *Flaviviridae* an. BVDV ist eines der wichtigsten pathogenen Viren des Rindes und verursacht der Milch- und Rindfleischindustrie weltweit signifikante wirtschaftliche Verluste.

Bei Infektionen während der Trächtigkeit kommt es zur transplazentaren Passage des BVDV und in der Folge zu Reproduktionsverlusten durch Aborte, Totgeburten oder lebensschwache Kälber. Manche überlebende Kälber entwickeln eine Immuntoleranz gegenüber dem Virus und scheiden für den Rest ihres Lebens große Menge des Erregers aus. Es ist wichtig, diese Trägartiere zu identifizieren, um den Infektionszyklus im Bestand zu unterbrechen. Trägartiere sterben oft innerhalb der ersten zwei Lebensjahre an Mucosal Disease (MD). Aufgrund der In-utero-Infektion stellt BVDV einen häufigen Kontaminanten biologischer Produkte wie Impfstoffe und Pharmazeutika dar.

BDV verursacht bei Schafe ähnliche Symptome, die allerdings leichter zu erkennen sind, da infizierte Lämmer mit abnormalem Vlies geboren werden und neurologische Symptome zeigen („Hairy Shaker“-Lämmer). Das Virus passiert bei trächtigen Mutterschafe die Plazenta, so dass persistent infizierte Lämmer geboren werden, die als Trägartiere und Virusausscheider für eine Perpetuierung der Infektion in der Herde verantwortlich sind.

LSIVet™ Ruminant BVD/BD p80 - Serum/Milk wurde zur Detektion von Antikörpern, die für ein in allen Stämmen von BVDV und BDV vorhandenes Protein spezifisch sind (Nichtstrukturprotein p80), entwickelt. Das Kit ist für folgende Probenmaterialien geeignet:

- Serumeinzelproben von Rinder sowie von Schafe zum Nachweis von anti-BVDV/BDV-Antikörpern.
- Einzel- oder Tankmilchproben von Rinder zum Nachweis von anti-BVDV-Antikörpern.

Für tierärztlichen Gebrauch. Ausschließlich für in vitro zu verwenden.

■ Testprinzip

Das Kit basiert auf dem Prinzip eines **Blocking-ELISA**.

1 – Proben und Kontrollen werden in die mit BVDV/BDV-Antigen beschichteten Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Sind anti-BVDV/BDV-spezifische Antikörper vorhanden, so binden diese an das Antigen und bilden Antigen-Antikörper-Komplexe.

2 – Nach dem Waschen wird monoklonales anti-p80-HRP-markiertes Konjugat hinzugefügt, das an die freien, auf der Platte verbliebenen Antigene bindet.

3 – Ungebundenes Konjugat wird herausgewaschen. Danach wird chromogenes Substrat hinzugefügt. Als Folge der Substratoxidation durch die Peroxidase des Konjugats kommt es zu einer Blaufärbung.

4 – Nach Stoppen der Reaktion ist ein Farbumschlag nach Gelb zu beobachten. Die Ergebnisse werden mit einem ELISA-Plattenleser abgelesen.

Positive Proben zeigen eine schwache bzw. gar keine Färbung.

■ Inhaltsstoffe

Bezeichnung	Beschreibung	Menge (480 Einzeltests)	Lagerung
1 – Mikrotiterplatte BVD	BVD-beschichtete Platte; 12 Streifen mit 8 Vertiefungen	5 Einheiten	5 ± 3°C [#]
2a – Negativkontrolle BVD (Serum)	Negativkontrolle (NK) für BVD im Serum	1 ml	5 ± 3°C
2b – Negativkontrolle BVD (Milch)	Negativkontrolle (NK) für BVD in Milch	2 ml	
3a – Positivkontrolle BVD (Serum)	Positivkontrolle (PK) für BVD im Serum	1 ml	
3b – Positivkontrolle BVD (Milch)	Positivkontrolle (PK) für BVD in Milch	2 ml	
4 – Konjugat BVD	Anti-p80-HRP-Konjugat, BVD (rosa)	60 ml	
A – Waschlösung (10x)	Waschlösung, 10-fach konzentriert	250 ml	
B – Proben-Verdünnungspuffer BVD	Gebrauchsfertig Probenverdünner, BVD (grün)	60 ml	
C – Substratlösung	Substratlösung	60 ml	
D – Stopplösung	Stopplösung	60 ml	
Platten-Klebestreifen		10	UT*

[#]Unbenutzte Streifen können im verschlossenen Beutel mit Trockenmittel (im Lieferumfang des Testkits enthalten) bei 5 ± 3°C bis zum Verfallsdatum des Kits gelagert werden.

*Umgebungstemperatur

■ Benötigtes Material, welches nicht im Lieferumfang enthalten ist

Präzisionspipetten, Multikanalpipetten	Einweg-Pipettenspitzen
Destilliertes oder deionisiertes Wasser	Mikrotiterplatten-Inkubator (37 ± 2°C)
ELISA-Plattenleser mit 450-nm-Filter oder 450- und 620-nm Filter	Einweg-Gefäße

■ Informationen zu Proben

Getestet werden können frische, gekühlte (bei 5 ± 3°C für 8 Tage) Serum- oder Milchproben oder zuvor tiefgefrorene (1 Jahr, < -16°C) Serumproben.

Milchproben mit oder ohne Konservierungsmittel sind geeignet. Vorzugsweise sollten keine eingefrorenen Milchproben verwendet werden.

Proben und Kontrollen müssen vor der Verwendung homogenisiert werden.

- **Einzelserumproben** und Kontrollen werden in **10-facher Verdünnung** getestet (**kurze oder lange Inkubation**).
- **Einzel- und Tankmilchproben** werden bei **2-facher Verdünnung** (mit verdünnter Waschlösung; **nur lange Inkubation**) getestet.

■ Vorbereitung der Reagenzien

- Die Reagenzien 1 – Mikrotiterplatte BVD, B – Proben-Verdünnungspuffer BVD, 4 - Konjugat BVD, C - Substratlösung und D - Stopplösung sind gebrauchsfertig.
- Die Reagenzien 2a - Negativkontrolle BVD (Serum), 2b - Negativkontrolle BVD (Milch), 3a - Positivkontrolle BVD (Serum) und 3b - Positivkontrolle BVD (Milch) werden wie Proben getestet.
- Die Reagenz A - Waschlösung (10x) muss mit destilliertem/deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt werden.

Beispiel: - Für 1 Streifen: 2 ml der Reagenz A - Waschlösung (10x) in 18 ml Wasser verdünnen; für 1 Platte: 25 ml der Reagenz A - Waschlösung (10x) in 225 ml Wasser verdünnen. Nach der Verdünnung mischen. Die verdünnte Waschlösung kann einen Monat lang bei $5 \pm 3^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

HINWEIS: Aufgrund der hohen Konzentration an Salzen kann der Reagenz A - Waschlösung (10x) Kristalle enthalten. Diese lassen sich durch Schütteln auflösen. Wir empfehlen die Homogenisierung der Lösung vor ihrer Verdünnung.

■ Testdurchführung

HINWEIS: Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur ($21 \pm 4^\circ\text{C}$) äquilibrieren lassen. Die Toleranz für die Inkubationszeiten beträgt $\pm 10\%$.

1. Verteilung der Kontrollen und Proben

A. Serumeinzelproben (10-fache Verdünnung)

- 10 μl 3a - Positivkontrolle BVD (Serum) in die Wells A1 und B1 geben (zum Beispiel).
- 10 μl 2a - Negativkontrolle BVD (Serum) in die Wells C1 und D1 geben (zum Beispiel).
- Jeweils 10 μl der Probe in die restlichen Wells geben.
- 90 μl der Reagenz B – Proben-Verdünnungspuffer BVD in alle Wells, die Kontrollen und Proben enthalten, geben.

B. Einzel- und Tankmilchproben

- 50 μl 3b - Positivkontrolle BVD (Milch) in die Wells A1 und B1 geben (zum Beispiel).
- 50 μl 2b - Negativkontrolle BVD (Milch) in die Wells C1 und D1 geben (zum Beispiel).
- 50 μl der Einzel- oder Tankmilchprobe in die restlichen Wells geben.
- 50 μl der verdünnten Waschlösung (siehe Punkt VII) in alle Wells, die Kontrollen und Proben enthalten, geben.

Vorsichtig mischen und die Platte mit einem Klebestreifen verschließen.

Einzelseren: Platte bei $5 \pm 3^\circ\text{C}$ über Nacht (16-18 Stunden) oder bei $37 \pm 2^\circ\text{C}$ für 1 Stunde inkubieren.

HINWEIS: Die Detektionseffizienz des Kit ist bei langer Inkubation besser.

Einzel- bzw. Tankmilchproben: Die Platte über Nacht (16-18 Stunden) bei einer Temperatur von $5 \pm 3^\circ\text{C}$ inkubieren.

2. Waschschrift

Die Wells leeren und 4-mal waschen, indem man je 300 μl der verdünnten Waschlösung (siehe Punkt VII) in jedes Well gibt. Alle Flüssigkeit aus den Wells entfernen und die Platte kräftig auf einem saugfähigen Papier ausklopfen, um alle Flüssigkeitsspuren zu entfernen. Der Waschschrift kann wahlweise entweder manuell oder automatisch (mit einem Plattenwascher) durchgeführt werden. Die Platte nicht ganz trocknen lassen.

3. Verteilung des Konjugats

100 μl der Reagenz 4 - Konjugat BVD in jedes Well geben. Vorsichtig mischen und die Platte mit einem neuen Klebestreifen verschließen. Platte bei $37 \pm 2^\circ\text{C}$ für 1 Stunde inkubieren.

4. Waschschritt

Den oben beschriebenen „Waschschritt“ wiederholen.

5. Reaktion

100 µl der Lösung **C - Substratlösung** in jedes Well geben. 2 Sekunden lang durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platte mischen. **Die Platte bei Raumtemperatur (21 ± 4°C) für 10 Minuten in Dunkelheit inkubieren.** Die Platte nicht abdecken.

100 µl der Lösung **D - Stopplösung** in jedes Well geben, wobei die gleiche Reihenfolge wie bei der Zugabe der Lösung **C - Substrate** einzuhalten ist. 2 Sekunden lang durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platte mischen.

6. Ablesen

Die Unterseite der Platte mit einem weichen Tuch abwischen. Platte **innen 30 Minuten nach Stoppen der Reaktion bei 450 nm** oder einer dualen Wellenlänge von **450-620 nm** mit dem Plattenleser **ablesen**.

■ Berechnungen

Zu berechnen ist die mittlere optische Dichte (ODm) der Positivkontrolle (PC): **ODm PC, sowie die mittlere optische Dichte (ODm) der Negativkontrolle (NC), ODm NC.**

Für jede Probe den Prozentsatz der Inhibition (% Inh) berechnen:

$$\% \text{ Inh} = [(\text{ODm NC} - \text{OD Probe}) / \text{ODm NC}] \times 100$$

HINWEIS: Bei negativen Proben kann sich für % Inh ein negativer Wert ergeben.

■ Validierung

Der Test gilt als validiert, wenn: **% Inh PC > 60% und ODm NC > 0,650**

■ Interpretation der Ergebnisse

EINZELSERUM	
ERGEBNIS	QUALITATIVE INTERPRETATION
% Inh < 30	NEGATIV
% Inh ≥ 30	POSITIV

EINZELMILCHPROBEN (Rind)	
ERGEBNIS	QUALITATIVE INTERPRETATION
% Inh < 30	NEGATIV
% Inh ≥ 30	POSITIV

TANKMILCHPROBEN (Rind)		
ERGEBNIS	QUALITATIVE INTERPRETATION	PRÄVALENZ POSITIVER TIERE (P)
% Inh < 35	NEGATIV	P < 10%
35 ≤ % Inh < 60	+ POSITIV	10% ≤ P < 30%
% Inh ≥ 60	++ POSITIV	P ≥ 30%

LSIVet™ Ruminant BVD/BD p80 - Serum/Milk


Fortsetzung


Ref. DBVDIL5

Publikationsnr. MAN0007795 Version A.0

Vorsichtsmassnahmen

1. Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Kit-Chargen zusammen verwenden.
2. Einmalartikel zum Pipettieren verwenden, um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.

 **ACHTUNG!** Sicherheitsdatenblätter (SDB) lesen und Handlungsanweisungen befolgen. Angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen (Brille, Kleidung, Handschuhe). Die Sicherheitsdatenblätter (SDB) sind abzurufen unter www.lifetechnologies.com/support.

 **ACHTUNG! BIOLOGISCHE GEFAHRENSTOFFE!** Sicherheitshinweise für biologische Gefahren des Produkts lesen; abzurufen unter www.lifetechnologies.com. Angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen (Brille, Kleidung, Handschuhe).

Dokumentation und Kundendienst

■ Anforderung von Sicherheitsdatenblätter (SDB)

Die SDB sind auf unserer Website unter der folgenden Adresse abzurufen: www.lifetechnologies.com/support.

HINWEIS: Zur Anforderung der SDB von Chemikalien, die nicht von Life Technologies vertrieben werden, wenden Sie sich bitte an den jeweiligen Anbieter des Produkts.

■ Supportanfragen

Allgemeine E-Mail-Adresse: LSI@lifetech.com.


E-Mail-Adresse technischer Support: LSIsupport@lifetech.com.

Weitere Serviceleistungen und Informationen finden Sie auf unserer Website: www.lifetechnologies.com/support.

■ Produkt mit eingeschränkter Gewährleistung

Life Technologies Corporation und ihre Tochtergesellschaften übernehmen die Gewährleistung für ihre Produkte im Rahmen der allgemeinen Geschäftsbedingungen, die auf der Website www.lifetechnologies.com/termsandconditions abzurufen sind. Wenn Sie Fragen haben, erreichen Sie den Kundendienst von Life Technologies unter folgender Internetadresse: www.lifetechnologies.com/support.

Für tierärztlichen Gebrauch. Ausschließlich für in vitro zu verwenden.

 6 Allée des Ecureuils - Parc Tertiaire de Bois-Dieu | 69380 Lissieu – Frankreich

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

NOTICE TO PUCHASER: LIMITED LICENSE

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform veterinary diagnostic services including reporting the results of such services for a fee, and internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell, repackage, or distribute this product, or any of its components, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

© 2013 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) or their respective owners.

5791 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008 USA
Phone +1 760 603 7200 | Toll Free in USA 800 955 6288
Visit lifetechnologies.com/support | Email LSI@lifetech.com
lifetechnologies.com

20 November 2013

