

SVANOVIR® PRV gE-Ab

Pseudorabies/Aujeszky's Disease Antibody Test

Pseudorabies/Aujeszky's Disease
Antikörper Test

Pseudorabia/Enfermedad de
Aujezsky prueba para anticuerpos

Test de détection d'anticorps anti-gE du
virus de la pseudorage/maladie d'Aujeszky

Contents	Art. No. SV-104902	Art. No. SV-104904
Microtitre plate Microtitre plates (96 wells) coated with non-infectious PRV antigen (sealed and stored dry)	2 (Strips) 12 x 8	10 (Plates)
Conjugate Ready-to-use (horseradish peroxidase conjugated anti-PRV gE monoclonal antibodies)	1 x 24 mL	1 x 120 mL
PBS-Tween Solution 20 x concentrate	1 x 125 mL	3 x 125 mL
Sample Dilution Buffer	1 x 8 mL	1 x 40 mL
Substrate Solution (Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H ₂ O ₂) - STORE IN THE DARK!	1 x 20 mL	1 x 100 mL
Stop Solution Contains sulphuric acid (2M) - DANGER!	 1 x 10 mL	2 x 25 mL
A. Positive Control Serum - Contains preservatives	1 x 2.5 mL	1 x 4.5 mL
B. Negative Control Serum - Contains preservatives	1 x 2.5 mL	1 x 4.5 mL

This manual covers the following SVANOVIR® PRV gE-Ab ELISA kits:
Article number SV-104902 and SV-104904

Pseudorabies/Aujeszky's Disease

Antibody Test

Name and Application

SVANOVIR® PRV gE-Ab is an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of PRV gE antibodies in porcine serum and plasma samples. The test will discriminate between animals infected and animals vaccinated with a gE-deleted vaccine).

General information

Pseudorabies Virus (PRV) or suid herpesvirus¹, first isolated by Aujeszky (1902) from an ox with signs of rabies, has the pig as the primary host, while cattle and some other animal species are secondary hosts with infected pigs as the initial source of infection. In countries with a high prevalence of endemic pseudorabies, this disease, being often, particularly in piglets, fatal, causes severe losses annually¹. In piglets, but also in older pigs, neurological disorders are intermingled with symptoms from the respiratory tract. The disease is less pronounced in older pigs and, after recovery, *i.e.* in adult pigs, a latent infection persists lifelong. From such asymptomatic pigs, PRV has been isolated from trigeminal ganglia and tonsils². Virus transmission occurs mainly through nasal secretions by contact or even by the aerogenic route¹. The infection of pregnant sows may reach via the placenta the fetuses and cause abortion, mummification or stillbirth. All infected herds in endemic regions should be monitored for the presence of infection and uninfected herds protected by control measures. Some countries practice vaccination, while some others try to control the spread by culling seropositive pigs or by combination of both measures.

Differentiation of vaccinated from infected pigs

If both control measures, *i.e.* vaccination and eradication by culling seropositive pigs are (or are to be) introduced, a differentiation of vaccinated pigs from those infected must be introduced, as both infected and vaccinated pigs are seropositive. Most vaccinal strains used are well-known attenuated strains with a deletion in their genome (DNA) of the gene sequence coding for the virulence factor, the glycoprotein E, (gE/gI)². Consequently, vaccinated pigs lack antibodies against the gE antigen. The differentiation is thus based on the presence of antibodies to gE in infected pigs but the absence of these antibodies in vaccinated pigs³.

Since both the vaccinal and field strains of PRV possess another glycoprotein, gB (gII), antibodies to gB are present in sera of both infected and vaccinated pigs but absent in sera of non-infected and non-vaccinated pigs⁴. The SVANOVIR® PRV gE and gB ELISA systems are based on these premises.

Principle

The kit procedure is based on the blocking Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In this procedure the gE-test, microtitre plates are coated with PRV antigen. This antigen is derived from an inactivated PRV strain, known to possess the glycoprotein gE (as well as gB). The indicator used for the detection of presence or absence of antibodies against gE is a monoclonal antibody (mAb) specifically directed against gE. The mAb are conjugated with the enzyme horse-radish peroxidase (HRP). If antibodies are absent in the test serum, *i.e.* from non-infected, non-vaccinated or vaccinated pigs, the gE antigen will remain free and the conjugated mAb subsequently added will bind. The enzyme present (HRP) will catalyze the

added substrate, which results in a colour reaction. If, on the other hand, antibodies against gE are present in the serum, *i.e.* from pigs infected with field virus, the antibodies will bind to the gE antigen in the well. This will block the possibility of the conjugated mAb subsequently added to react with the gE antigen. The unbound conjugated mAb will be removed by the washing procedure followed, resulting in no colour reaction when the substrate is added.

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

Specimen information

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

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 pipet tip for each sample.
10. Do not pipet by mouth.
11. Include positive and negative 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!

For article SV-104902, strips with broken seal can be stored at 2-8°C (36-46°F) for up to 4 weeks.

There is always a surplus volume for the liquid reagent.

The volume mentioned on the label is the minimum obtainable.

Procedure

1. All reagents should equilibrate to room temperature 18-25°C (64-77°F) before use. Label each strip with a number.

Short sample incubation:

2. Add 100 µL of Positive Control Serum (reagent A) and 100 µL of Negative Control Serum (reagent B) respectively, to selected wells coated with PRV antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the control sera in duplicates.
3. Add 100 µL of undiluted serum sample to a selected well coated with PRV antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.
4. Seal the plate/strip and incubate at 37°C (98.6°F) for 1 hour.

Subsequently continue as from step #8.

Over Night Incubation:

5. Add 25 µL of Sample Dilution Buffer to all wells.
6. Repeat step #2 and step #3.
7. Seal the plate/strip and incubate at room temperature, 18-25°C (64-77°F) overnight (12-18 hours).
8. Rinse the plates/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
9. Add 100 µL of Conjugate to each well. Seal the plate/strips and incubate at 37°C (98.6°F) for 30 minutes or at room temperature 18-25°C (64-77°F) for 60 minutes.
10. Repeat step #8.
11. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 15 minutes at room temperature 18-25°C (64-77°F). Begin timing when the first well is filled
12. 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 #11.

13. Measure the optical density (OD) of the controls and samples at 450 nm in a microplate photometer (use air as a blank). Measure the OD within 15 minutes after the addition of Stop Solution to prevent fluctuation in OD values.

Calculations

1. Calculate the mean optical density (OD) value for each of the control sera.
2. Calculate the optical density percentage (ODp) for each sample and for the positive control sera using the following formula:

$$\text{ODp} = \frac{\text{OD}_{\text{Sample/Pos control}}}{\text{OD}_{\text{Negative control}}} \times 100$$

Interpretation of the results

Criteria for test validity

To ensure validity, the duplicate OD values of the negative 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	Negative Control	0.8 -1.6
ODp	Positive Control	< 30

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

Interpretation

Short sample incubation:

1. **ODp $\leq$ 50 = positive**

Serological diagnosis:
Field virus infected.

2. **ODp > 60 = negative**

Serological diagnosis: Either

a) non-infected with field virus and no vaccinated against Aujeszky or

b) non-infected with field virus b t vaccinated with an Aujeszky disease gE-deleted vaccine.

3. **ODp 51 - 60 = doubtful**

Retest the sample. If the test result is still doubtful, a new sample should be taken from the animal and both samples should be run in parallel.

Over Night sample incubation:

1. **ODp $\leq$ 45 = positive**

Serological diagnosis:
Field virus infected.

2. **ODp > 55 = negative**

Serological diagnosis: Either

a) non-infected with field virus and no vaccinated against Aujeszky or

b) non-infected with field virus b t vaccinated with an Aujeszky disease gE-deleted vaccine.

3. **ODp 46 - 55 = doubtful**

Retest the sample. If the test result is still doubtful, a new sample should be taken from the animal and both samples should be run in parallel.

To evaluate whether the animal, for which a test serum score negative, is vaccinated, it is recommended to test the serum in the SVANOVIR® PRV gB-Ab test (Art. No. SV-104905/SV-104906).

References

1. Gustafson, D.P. (1986) Pseudorabies. 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, pp. 274-289.
2. Rziha, H.-J., Döller, P.C., and Wittman, G. (1982) Detection of Aujeszky's Disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science., Vol. 17, Aujeszky's Disease. Edited by G. Wittman and S.A. Hall. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 205-214.
3. Baskerville A., Mc Ferran, J.B., and Dow, C. (1973) Aujeszky's Disease in pigs. The Vet. Bull. 43,465-480.
4. Soerensen, K.J., and Lei, J.C. (1986) Aujeszky's Disease: blocking ELISA for the detection of serum antibodies. J. Vir. Mth. 13, 171-181.



***DANGER: Stop solution (sulphuric acid)**

May be corrosive to metals. Causes skin irritation. Causes serious eye irritation.

Keep only in original container. Wear eye protection/ face protection. Wear protective gloves.

IN CASE OF CONTACT WITH EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician. If eye irritation persists: Get medical advice/ attention.

IN CASE OF CONTACT WITH SKIN: Wash with plenty of soap and water. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. Absorb spillage to prevent material damage.

License holder

INDICAL BIOSCIENCE GmbH
Deutscher Platz 5b
04103 Leipzig
Germany
www.indical.com



Indical Sweden AB

Box 1545

SE-751 45 Uppsala, Sweden

www.svanova.com

Customer Service

support@indical.com

Zusammensetzung	Artikelnummer SV-104902	Artikelnummer SV-104904
Mikrotiterplatten Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) beschichtet mit nicht infektiösem PRV Antigen (versiegelt und trocken)	2 (Streifen) 12 x 8	10 (Platten)
Konjugat Gebrauchsfertig (Meerrettichperoxidase-konjugierte anti-PRV gE monoklonale Antikörper)	1 x 24 ml	1 x 120 ml
PBS-Tween-Lösung 20-fach konzentriert	1 x 125 ml	3 x 125 ml
Probenverdünnungspuffer	1 x 8 ml	1 x 40 ml
Substratlösung (Tetramethylbenzidin und H ₂ O ₂ gelöst in Substratpuffer) - IM DUNKELN AUFBEWAHREN!	1 x 20 ml	1 x 100 ml
Stopplösung Enthält Schwefelsäure (2M) - GEFAHR!	 1 x 10 ml	2 x 25 ml
A. Positives Kontrollserum - enthält ein Konservierungsmittel	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml
B. Negatives Kontrollserum - enthält ein Konservierungsmittel	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml

Diese Gebrauchsinformation umfasst die Testkits mit den Artikelnummern: SV-104902 und SV-104904

Pseudorabies/Aujeszky's Disease

Antikörper Test

GEBRAUCHSINFORMATION; nach §11 Absatz 2 TierGesG zugelassen; Zul.Nr.:FLI-B 425

Name und Anwendung

Der SVANOVIR® PRV gE-Ab Test ist ein *In vitro*-Diagnostikum (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen PRV gE im Blutserum und -plasma von Schweinen.

Allgemeine Information

Das Pseudowut-Virus (PRV) oder Suides Herpesvirus 1 wurde von Aujeszky 1902 erstmals bei einem Ochsen, der Tollwut-Symptome aufwies, isoliert. Der primäre Wirt ist das Schwein, während Rinder und andere Tierarten sekundäre Wirte darstellen. Die Krankheit geht von infizierten Schweinen aus. In Ländern mit einer hohen Prävalenz der endemischen Pseudowut verursacht diese Krankheit, die insbesondere bei Ferkeln oft tödlich verläuft, jährlich hohe wirtschaftliche Verluste¹. Bei Ferkeln, aber auch bei älteren Schweinen treten neben neurologischen Störungen auch Symptome im Respirations-trakt auf. Die Krankheit ist weniger ausgeprägt bei älteren Schweinen und nach überstandener Krankheit persistiert das Virus lebenslang im Organismus. Bei derart asymptomatischen Schweinen wurde das PRV aus den Trigeminusganglien und den Tonsillen² isoliert. Die Virusübertragung erfolgt hauptsächlich über Nasensekrete durch direkten Kontakt, aber auch über den Luftweg¹. Bei trächtigen Sauen kann die Infektion über die Plazenta die Föten erreichen und zu Aborten, Totgeburten oder der Geburt von mumifizierten Ferkeln führen. In Endemieregionen sollten alle infizierten Herden überwacht und nicht infizierte Herden durch Kontrollmaßnahmen geschützt werden. In einigen Ländern werden Impfungen eingesetzt, während man in anderen versucht, die Ausbreitung durch Keulung seropositiver Schweine oder durch eine Kombination beider Maßnahmen zu verhindern.

Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Schweinen

Werden beide Kontrollmaßnahmen, d.h. Impfung und Keulung seropositiver Schweine, eingesetzt oder beabsichtigt, ist eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren erforderlich, da sowohl infizierte als auch geimpfte Tiere seropositiv sind. Die meisten verwendeten Impfstämme sind bekannte attenuierte Stämme mit einer Deletion in ihrem Genom (DNA). Es fehlt die Gensequenz, die den Virulenzfaktor, Glykoprotein E (gE/gI)², kodiert. Infolgedessen weisen geimpfte Schweine keine Antikörper gegen das gE-Antigen auf. Die Unterscheidung beruht daher auf der Anwesenheit von Antikörpern gegen gE bei infizierten Schweinen und der Abwesenheit dieser Antikörper bei geimpften Schweinen³.

Da sowohl Impf- als auch Feldstämme des PRV ein weiteres Glykoprotein, gB (gII) aufweisen, sind Antikörper gegen gB in den Seren von infizierten und geimpften Tieren präsent, jedoch nicht in den Seren nicht infizierter und ungeimpfter Schweine⁴. Die SVANOVIR® PRV gE und gB ELISA-Tests beruhen auf diesen Gegebenheiten.

Diagnostisches Verfahren

Beim gE-Test sind die Mikrotiterplatten mit PRV-Antigen beschichtet. Dieses Antigen stammt von einem inaktivierten PRV-Stamm, von dem man weiß, dass er über Glykoprotein E (wie auch über gB) verfügt. Der zum Nachweis von Antikörpern gegen gE verwendete Indikator ist ein spezifischer gegen gE gerichteter monoklonaler Antikörper (mAk). Diese monoklonalen Antikörper sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Wenn im Testserum keine Antikörper vorhanden sind, d.h. das Blut von nicht infizierten, nicht geimpften oder mit gE-deletierter Vakzine geimpften Schweinen stammt, bleibt das gE-Antigen frei und die anschließend zugefügten konjugierten mAk binden. Das anwesende Enzym (HRP) katalysiert die Reaktion nach Zugabe des Substrats und es kommt zu einer Farbreaktion.

Wenn jedoch im Serum Antikörper gegen gE vorhanden sind, d.h. das Blut von Schweinen stammt, die mit dem Feldvirus infiziert sind, werden diese Antikörper in den Vertiefungen der Platte an das gE-Antigen binden. Dadurch können die anschließend zugeführten konjugierten mAk nicht an das gE-Antigen binden. Die ungebundenen konjugierten mAk werden beim anschließendem Waschvorgang entfernt und es kommt bei Zugabe des Substrats zu keiner Farbreaktion. Dieser Test eignet sich also zur Unterscheidung zwischen infizierten (positives Ergebnis) und mit gE deletiertem Vakzin geimpften Tieren (negatives Ergebnis).

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 Waschlösung (1 bis 2 Liter)
6. Photometer für die Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter

Probenvorbereitung

Für jede Probe werden 100 µl Blutserum oder Blutplasma benötigt. Frisches, gekühltes oder zuvor tief gefrorenes Serum oder Plasma können verwendet werden.

Zubereitung der Reagenzien

Wasch-Puffer (PBS-Tween-Lösung):

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

Für Artikel SV-104902: die angebrochene Verpackung kann bei Lagerung zwischen 2°-8°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden. Die Mengenangaben auf dem Etikett sind Mindestmengen. Die tatsächlich enthaltenen Mengen der flüssigen Reagenzien überschreiten diese Mindestmengen immer.

Durchführung des Tests

1. Alle Reagenzien sollen Raumtemperatur, (18-25°C) haben. Jeden Streifen mit einer Nummer versehen.

Kurze Inkubation:

2. Geben Sie in jede der für die Kontrollen (Doppelansatz) vorgesehenen Reaktionsvertiefungen 100 µl des gE-positiven Kontrollserums (Reagenz A) bzw. 100 µl des gE-negativen Kontrollserum (Reagenz B).
3. Geben Sie in jede der vorgesehenen Reaktionsvertiefungen 100 µl der unverdünnten Serum-/Plasmaprobe. Zu Bestätigungszwecken wird empfohlen die Proben im Doppelansatz zu untersuchen.
4. Kleben Sie die Mikrotiterplatte(n) ab. Inkubieren Sie anschließend 1 Stunde bei 37°C.
Weiter bei Punkt 8.

Lange (über Nacht) Inkubation:

5. Zur Inaktivierung mittels Probenverdünnungspuffer anstelle der Hitzeinaktivierung geben Sie in jede der für die Kontrollen und Serum-/Plasmaproben vorgesehenen Reaktionsvertiefungen 25 µl Probenverdünnungspuffer.
6. Den Vorgang in Punkten 2 und 3 folgen.
7. Kleben Sie die Mikrotiterplatte(n) ab und schütteln diese wiederholt vorsichtig. Inkubieren Sie anschließend über Nacht (12-18 Stunden) bei Raumtemperatur, 18-25°C.
8. Entleeren Sie danach die Reaktionsvertiefungen und spülen Sie diese dreimal mit dem Wasch-Puffer (mindestens 300 µl pro Vertiefung), entfernen Sie dann die Flüssigkeit gründlich.
9. Geben Sie in jede Reaktionsvertiefung 100 µl der Konjugatlösung. Mischen Sie gründlich. Kleben Sie die Mikrotiterplatte(n) ab und inkubieren Sie 30 Minuten bei 37°C oder 60 Minuten bei Raumtemperatur, 18-25°C.
10. Wiederholen Sie den Vorgang, der in Punkt 8 beschrieben wurde.

11. Geben Sie in jede Reaktionsvertiefung 100 µl der Substratlösung und inkubieren Sie 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C). Beginnen Sie mit der Zeitmessung nach Füllen der ersten Reaktionsvertiefung.
12. Geben Sie 50 µl Stopplösung in jede Reaktionsvertiefung, und zwar in der gleichen Reihenfolge, in der Sie die Substratlösung zugegeben haben.
13. Messen Sie die Extinktionswerte (OD) der Serumproben und der Kontrollen sofort (innerhalb 15 Minuten nach dem Zusatz der Stopplösung) mit einem Photometer bei 450 nm.

Auswertung

1. Berechnen Sie die Mittelwerte der optischen Dichte (OD) der Kontrollen.
2. Berechnen Sie den Prozentsatz der optischen Dichte (ODp) für jede Probe und für die positive Kontrolle nach folgender Formel:

$$\text{ODp} = \frac{\text{OD}_{\text{der Probe/des positives Kontrollserum}}}{\text{OD}_{\text{des negativen Kontrollserums}}} \times 100$$

Interpretation der Ergebnisse

Validitätskriterien

Um die Validität zu gewährleisten, sollte der OD-Wert der einzelnen Ergebnisse des Doppelansatzes für die Positive Kontrolle um nicht mehr als 25 % vom Mittelwert des Doppelansatzes abweichen.

Zusätzlich sollten die Kontrollwerte innerhalb der folgenden Grenzen liegen:

negatives Kontrollserum: OD 0,8-1,6

positives Kontrollserum: ODp < 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.

Interpretation der Ergebnisse

Kurze Inkubation:

1. **ODp $\leq$ 50 = positiv**

Antikörper gegen Antigen gE vorhanden.
Serologische Diagnose: AK-Feldvirus infiziert.

2. **ODp > 60 = negativ**

Meßbare Antikörper gegen Antigen gE nicht vorhanden
Serologische Diagnose: entweder
a) nicht AK-Feldvirus infiziert und nicht geimpft gegen Aujeszky oder
b) nicht mit AK-Feldvirus infiziert aber mit einem gE-deletierten Aujeszky Vakzin geimpft.

3. **ODp 51 - 60 = zweifelhaft**

Eindeutige Beurteilung nicht möglich.
Serologische Diagnose: Wiederholungsuntersuchung.
Ist das Ergebnis in der erneuten Prüfung wieder zweifelhaft, ist eine weitere Probe des Tieres nach ca. 2 Wochen zu untersuchen.

Lange Inkubation:

1. **ODp $\leq$ 45 = positiv**

Antikörper gegen Antigen gE vorhanden.
Serologische Diagnose: AK-Feldvirus infiziert.

2. **ODp > 55 = negativ**

Meßbare Antikörper gegen Antigen gE nicht vorhanden
Serologische Diagnose: entweder
a) nicht AK-Feldvirus infiziert und nicht geimpft gegen Aujeszky oder
b) nicht mit AK-Feldvirus infiziert, aber mit einem gE-deletierten Aujeszky Vakzin geimpft.

3. **ODp 46 - 55 = zweifelhaft**

Eindeutige Beurteilung nicht möglich.
Serologische Diagnose: Wiederholungsuntersuchung.
Ist das Ergebnis in der erneuten Prüfung wieder zweifelhaft, ist eine weitere Probe des Tieres nach ca. 2 Wochen zu untersuchen.

Nicht erfaßt werden mit diesem Test Tiere, die nicht infiziert, jedoch geimpft sind (mit gE deletierter Vakzine). Solche Tiere können identifiziert werden, wenn zusätzlich auf das Glykoprotein gB, das sowohl bei Feld- als auch bei Impfstämmen immer vorhanden ist, getestet wird.

Hierfür steht der SVANOVIR® PRV gB-Ab Artikelnummer: SV-104905/SV-104906 zur Verfügung.

Referenzen

1. Gustafson, D.P. (1986) Pseudorabies. 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, pp. 274-289.
2. Rziha, H.-J., Döller, P.C., and Wittman, G. (1982) Detection of Aujeszky's Disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science., Vol. 17, Aujeszky's Disease. Edited by G. Wittman and S.A. Hall. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 205-214.
3. Baskerville A., Mc Ferran, J.B., and Dow, C. (1973) Aujeszky's Disease in pigs. The Vet. Bull. 43,465-480.
4. Soerensen, K.J., and Lei, J.C. (1986) Aujeszky's Disease: blocking ELISA for the detection of serum antibodies. J. Vir. Mth. 13, 171-181.

Für den SVANOVIR® PRV gE-Ab ist die spezifische Reaktion mit folgenden gE-deletierten Aujeszky-Impfstoffen bewiesen: Ingelvac Aujeszky MLV (Boehringer Ingelheim)

ARRAVAC (Hoechst AG)
ARRAVAC L (Hoechst AG)
ARRAVAC L i.n/i.m. (Hoechst AG)
Auskimmune K (Norden)
Auskimmune L (Norden)
Geskalon gl- (Rhone-Merieux)
Geskypur (Rhone-Merieux)
Gletvax AK (Pitman Moore)
Jespur gl- (Rhone-Merieux)
Nobi-Porvac (Vemie)
Nobi-Vac Aujeszky-gl- (Vemie)
suvaxyn i-Bartha o/w (Salsbury)
suvaxyn L-Bartha w (Salsbury)
suvaxyn L-Bartha o/w (Salsbury)

Lizenzinhaber

INDICAL BIOSCIENCE GmbH
Deutscher Platz 5b
04103 Leipzig
Germany
www.indical.com



*GEFAHR: Stopplösung (Schwefelsäure)

Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht Hautreizungen.

Verursacht schwere Augenreizung.

Nur im Originalbehälter aufbewahren.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/

Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige

Minuten lang behutsam mit Wasser

ausspülen. Eventuell vorhandene

Kontaktlinsen nach Möglichkeit

entfernen. Weiter ausspülen. Sofort

GIFTINFORMATIONSZENTRUM/ Arzt/

anrufen. Bei anhaltender Augenreizung:

Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe

hinzuziehen.

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel

Wasser/waschen.

Kontaminierte Kleidung ausziehen und

vor erneutem Tragen waschen. Bei

Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/

ärztliche Hilfe hinzuziehen. Verschüttete

Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu

vermeiden.



Indical Sweden AB

Box 1545

SE-751 45 Uppsala, Sweden

www.svanova.com

Kundenservice

support@indical.com

Contenido	Nº de artículo SV-104902	Nº de artículo SV-104904
Microplacas Microplacas (96 pocillos) recubiertas con antígeno PRV no infeccioso (sellada y almacenado en seco)	2 (Tiras) 12 x 8	10 (Placas)
Conjugado Listo para usar (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales anti-PRV gE)	1 x 24 ml	1 x 120 ml
Solución PBS-Tween 20x concentrado	1 x 125 ml	3 x 125 ml
Tampón para dilución de muestra	1 x 8 ml	1 x 40 ml
Solución de sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de sustrato con H ₂ O ₂) - ALMACENAR EN OSCURO _i	1 x 20 ml	1 x 100 ml
Solución frenadora Contiene ácido sulfúrico (2M) - PELIGRO _i	 1 x 10 ml	2 x 25 ml
A. Suero control positivo - contiene conservante	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml
B. Suero control negativo - contiene conservante	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml

Manual de kits ELISA SVANOVIR®
PRV gE-Ab:
Nº artículos: SV-104902 y
SV-104904

Pseudorabia/Enfermedad de Aujeszky prueba para anticuerpos

Nombre y aplicación

SVANOVIR® PRV gE-Ab es un kit de ELISA para la detección de anticuerpos contra PRV gE en muestras porcinas de suero o plasma. El kit discrimina entre animales infectados y animales vacunados con una vacuna de delección gE.

Información general

El virus de la Pseudorabia (PRV) o herpesvirus suino 1, aislado por Aujeszky (1902) de un buey con síntomas de rabia, tiene al cerdo como huésped primario. Los bovinos y algunas otras especies animales son huéspedes secundarios siendo el cerdo fuente inicial de infección. En países con alta prevalencia de pseudorabia endémica, la enfermedad es fatal especialmente en lechones, ocasionando graves pérdidas económicas¹. Los desórdenes neurológicos en lechones y cerdos adultos, se alternan con síntomas del tracto respiratorio. La enfermedad es menos severa en animales adultos quienes una vez recuperados se convertirán en portadores latentes de por vida. PRV, puede aislarse de cerdos asintomáticos principalmente de ganglios trigeminales y tonsilas². La transmisión del virus ocurre mediante secreción nasal, vía contacto directo o aerosol¹. La infección de cerdas preñadas puede llegar al feto vía placenta y ocasionar abortos, momificación del feto y partos de fetos muertos. Todas las piaras en regiones endémicas, deben monitorearse serológicamente para detectar la presencia de la infección. Las piaras no infectadas deben protegerse, aplicándose medidas de control. Algunos países practican la vacunación y otros tratan de controlar la enfermedad mediante la eliminación de cerdos sero-positivos o mediante ambas medidas.

Diferenciación de cerdos vacunados de cerdos infectados

Si las medidas de control, es decir de vacunación y erradicación mediante sacrificio de cerdos sero-positivos, han sido (o deben ser) introducidas, debe considerarse el diagnóstico diferencial de cerdos vacunados de aquellos naturalmente infectados, ya que en ambos casos los animales son sero-positivos. La mayoría de cepas vacunales son cepas atenuadas que tienen una delección en el genoma (DNA) correspondiente a la secuencia de un gen que codifica el factor de virulencia, la glicoproteína E (gE/gI)². Consecuentemente los cerdos vacunados con esta cepa carecen de anticuerpos contra el antígeno gE. En este caso la diferenciación se basa en la presencia de anticuerpos contra gE en cerdos infectados y la ausencia de estos anticuerpos en cerdos vacunados³. Debido a que tanto las cepas de PRV vacunales como las de campo, poseen otra glicoproteína, gB (gII), anticuerpos contra gB están presentes en el suero de cerdos infectados y vacunados, pero ausentes en el suero de cerdos no infectados y no vacunados⁴. El kit de ELISA de SVANOVIR® PRV gE y gB se basa en estas premisas.

Principio

El principio del kit se basa en un ELISA de bloqueo en fase sólida. En este procedimiento se utilizan microplacas/tiras sensibilizadas con antígeno PRV inactivado conteniendo la glicoproteína gE (y también gB). El indicador utilizado para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos en el suero contra gE es un anticuerpo monoclonal, (mAb) específico contra gE. Los anticuerpos están conjugados con la enzima de rábano picante (HRP). Si la muestra no contiene anticuerpos contra gE (es decir de cerdos no infectados, no-vacunados o vacunados) el antígeno gE permanece "libre" y reaccionará con los mAbs conjugados

agregados posteriormente. La enzima HRP del conjugado catalizará al sustrato, dando como resultado una reacción de color. Al contrario, si la muestra contiene anticuerpos contra gE, (cerdos infectados con cepas de campo), estos anticuerpos reaccionarán con el antígeno gE en la placa, bloqueando la posibilidad de que los mAbs agregados posteriormente, reaccionen con el antígeno gE. Estos se remueven por lavado y al agregarse el sustrato, el resultado será la ausencia de color.

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. Recipiente: de 1 a 2 litros para PBS-Tween
6. Fotómetro para microplacas, filtro de 450 nm

Información de las muestras

Se necesitan 100 µl de suero sanguíneo o plasma para cada pocillo/muestra. Se puede utilizar sueros o plasma frescos, refrigerados o previamente congelados.

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.
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

Las tiras selladas del artículo SV-104902 una vez abiertas, pueden almacenarse a una temperatura de 2-8°C hasta 4 semanas. 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.

Procedimiento

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

Incubación corta de las muestras:

2. Añadir 100 µl de suero control positivo (reactivo A) y 100 µl del suero control negativo (reactivo B) respectivamente a cada uno de los pocillos apropiados, sensibilizados con el antígeno PRV. Para confirmación se recomienda correr controles en duplicado.
3. Añadir 100 µl de suero muestra no diluido a cada uno de los pocillos apropiados sensibilizados con el antígeno PRV. Para confirmación se recomienda correr las muestras en duplicado.
4. Sellar la microplaca/tira e incubar a 37°C por 60 minutos. Continuar luego como en paso #8.

Incubación de las muestras durante la noche:

5. Añadir 25 µl de la dilución tampón de la muestra a todos los pocillos.
6. Repita los pasos #2 y #3.
7. Sellar la microplaca/tira e incubar a temperatura ambiente 18-25°C durante la noche (12-18 horas).
8. Enjuagar las placas/tiras 3 veces con tampón PBS-Tween: en cada ciclo de enjuague, rellenar los pocillos, vaciar la placa y golpear sobre una superficie cubierta con material absorbente para eliminar todo resto de líquido.
9. Añadir 100 µl de conjugado HRP a cada pocillo, sellar la microplaca/tira e e incubar a 37°C por 30 minutos o a temperatura ambiente 18-25°C por 60 minutos.
10. Repetir el paso # 8.
11. Añadir 100 µl de la solución sustrato a cada pocillo. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, 18-25°C. Comenzar a cronometrar al llenar el primer pocillo.
12. Interrumpir la reacción añadiendo 50 µl de solución frenadora a cada pocillo y mezclar bien. Añadir la solución frenadora en el mismo orden que con la solución de sustrato en el paso # 11.

13. 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.

Cálculos

1. Calcular los valores medios de DO de los sueros controles.
2. Calcular el porcentaje de densidad óptica (DOp) para cada muestra y para los dos sueros de referencia utilizando la siguiente fórmula:

$$DOp = \frac{DO_{\text{Muestra/control pos}}}{DO_{\text{control neg}}} \times 100$$

Interpretación de resultados

Criterios de validez de la prueba

Para confirmar la validez, los valores duplicados de DO del control negativo no deben diferir en más de un 25% del valor medio de los dos duplicados. Además, los valores de control deben encontrarse entre los límites siguientes:

DO Control negativo 0,8 -1,6

DOp Control positivo < 30

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se considerará válida. Si la prueba no es válida, es probable que se deba a errores en la técnica y la prueba debe repetirse.

Interpretación de resultados

Incubación corta de las muestras:

1. DOp $\leq$ 50 = positivo

Diagnóstico serológico: Animales infectados con virus de campo.

2. DOp $>$ 60 = negativo

Diagnóstico serológico:

a) no infectado con virus de campo y no vacunado contra Aujeszky o,

b) no infectado con virus de campo pero vacunado contra Aujeszky con vacuna con delección gE.

3. DOp 51 - 60 = dudosa

La prueba debe repetirse. Si el resultado de la muestra sigue dudoso, una nueva muestra debe ser tomada y ambas muestras deben correrse en paralelo.

Incubación de las muestras durante la noche:

1. ODp $\leq$ 45 = positivo

Diagnóstico serológico: Animales infectados con virus de campo.

2. ODp $>$ 55 = negativo

Diagnóstico serológico:

a) no infectado con virus de campo y no vacunado contra Aujeszky o,

b) no infectado con virus de campo pero vacunado contra Aujeszky con vacuna con delección gE.

3. ODp 46 - 55 = dudosa

La prueba debe repetirse. Si el resultado de la muestra sigue dudoso, una nueva muestra debe ser tomada y ambas muestras deben correrse en paralelo.

Para evaluar si el animal considerado negativo, está vacunado, se recomienda correr una muestra de suero con ELISA SVANOVIR® PRV gB-Ab test, N° de artículos SV-104905/SV-104906.

Referencias

1. Gustafson, D.P. (1986) Pseudorabies. 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, pp. 274-289.
2. Rziha, H.-J., Döller, P.C., and Wittman, G. (1982) Detection of Aujeszky's Disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs. In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science., Vol. 17, Aujeszky's Disease. Edited by G. Wittman and S.A. Hall. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 205-214.
3. Baskerville A., Mc Ferran, J.B., and Dow, C. (1973) Aujeszky's Disease in pigs. The Vet. Bull. 43,465-480.
4. Soerensen, K.J., and Lei, J.C. (1986) Aujeszky's Disease: blocking ELISA for the detection of serum antibodies. J. Vir. Mth. 13, 171-181.



***PELIGRO: Solution frenadora (ácido sulfúrico)**

Puede ser corrosivo para los metales. Provoca irritación cutánea.

Provoca irritación ocular grave. Conservar únicamente en el recipiente original. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. Si persiste la irritación ocular: consultar a un médico.

EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón. Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. En caso de irritación cutánea: consultar a un médico. Absorber el vertido para que no dañe otros materiales.

Titular de la licencia

INDICAL BIOSCIENCE GmbH

Deutscher Platz 5b

04103 Leipzig

Germany

www.indical.com



Indical Sweden AB

Box 1545

SE-751 45 Uppsala, Sweden

www.svanova.com

Servicio al cliente

support@indical.com

Contenu	N° d'article SV-104902	N° d'article SV-104904
Microplaques Microplaques (96 puits) sensibilisées avec l'antigène PRV non infectieux (scellées et gardées au sec)	2 (Barettes) 8 x 12	10 (Plaques)
Conjugué Prêt à l'emploi (peroxydase de raifort conjugué à des anticorps monoclonaux anti-PRV gE)	1 x 24 ml	1 x 120 ml
Solution de PBS Tween Concentrée 20 fois	1 x 125 ml	3 x 125 ml
Tampon de dilution des échantillons	1 x 8 ml	1 x 40 ml
Solution de substrat (Tétraméthylbenzidine dans le tampon de substrat contenant H ₂ O ₂) - CONSERVER À L'OBSCURITÉ!	1 x 20 ml	1 x 100 ml
Solution d'arrêt Contient de l'acide sulfurique (2M) - DANGER!	 1 x 10 ml	2 x 25 ml
A. Sérum de contrôle positif - Contient des agents conservateurs	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml
B. Sérum de contrôle négatif - Contient des agents conservateurs	1 x 2,5 ml	1 x 4,5 ml

Cette notice concerne les trousses
ELISA SVANOVIR® PRV gE-Ab
suivants : Articles n° SV-104902
et SV-104904

Test de détection d'anticorps anti-gE du virus de la pseudorage/maladie d'Aujeszky

Nom et application

SVANOVIR® PRV gE-Ab est une épreuve immunoenzymatique permettant la détection d'anticorps anti-gE (glycoprotéine E) du virus de la pseudorage (PRV) dans des prélèvements de plasma et de sérum porcin. Le test permet de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés avec un vaccin dépourvu du gène de la gE.

Informations générales

Le virus de la pseudo-rage (PRV) ou L'herpesvirus-1 porcin a été isolé pour la première fois par Aujeszky (en 1902) à partir d'un boeuf présentant des signes de rage. Son hôte définitif est le porc, tandis que le bétail et d'autres espèces d'animaux sont des hôtes intermédiaires, avec des porcs infectés comme source initiale d'infection. Dans les pays comportant une forte prévalence de pseudo-rage endémique, cette maladie souvent fatale, en particulier chez les porcelets, entraîne de lourdes pertes chaque année¹. Chez le porcelet, mais également chez le porc plus âgé, les troubles neurologiques se combinent avec des symptômes au niveau des voies respiratoires. La maladie est moins prononcée chez le porc plus âgé et après rétablissement du sujet atteint, une infection latente persiste pendant le restant de sa vie. A partir de ces porcs asymptomatiques, le PRV a été isolé des à partir de ganglions semi-lunaires et d'amygdales². La transmission du virus s'effectue principalement par les sécrétions nasales par simple contact ou par voie aérienne¹. L'infection d'une truie gestante peut atteindre les fœtus par le placenta et provoquer un avortement, une momification ou une mort fœtale tardive. Dans les zones endémiques, les troupeaux infectés doivent être contrôlés pour détecter la présence d'une infection et les troupeaux non infectés doivent être protégés par des mesures de contrôle. Certains pays effectuent la vaccination, alors que d'autres essaient de contrôler la propagation en abattant les porcs séropositifs ou en associant les deux mesures.

Différenciation entre les porcs vaccinés et les porcs infectés

Si les deux mesures de contrôle, c'est-à-dire la vaccination et l'éradication par abattage des porcs séropositifs (ou vont être) introduites, il faut effectuer une différenciation entre les porcs vaccinés et les porcs infectés, puisqu'ils sont tous séropositifs. La plupart des souches vaccinales utilisées sont des souches atténuées bien connues avec une suppression dans leur génome (ADN) de la séquence de gène codant pour le facteur de la virulence, la glycoprotéine E (gE/gI)². Par conséquent, les porcs vaccinés manquent d'anticorps contre l'antigène gE. La différenciation repose donc sur la présence d'anticorps anti-gE chez les porcs infectés mais l'absence de ces anticorps chez les porcs vaccinés³.

Puisque les souches vaccinales et les souches sauvages de PRV possèdent toutes une autre glycoprotéine, la gB (gII), des anticorps anti-gB sont présents dans le sérum des porcs infectés et vaccinés mais absents dans le sérum des porcs non infectés et non vaccinés⁴. Les systèmes ELISA SVANOVIR® PRV gE et gB sont basés sur ce postulat.

Principe

La méthode repose sur un test immunoenzymatique blocage en phase solide (ELISA de blocage). Dans le test de détection des gE, des microplaques sont recouvertes d'antigènes PRV. Cet antigène provient d'une souche de PRV inactivée, connue pour posséder la glycoprotéine gE (ainsi que la glycoprotéine gB). L'indicateur utilisé pour la détection de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-gE est un anticorps monoclonal (AcM) spécifiquement dirigé contre la gE. Les anticorps monoclonaux sont préalablement conjugués à l'enzyme peroxydase du Raifort (HRP). S'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum testé, c'est-à-dire de porcs non infectés, non vaccinés ou vaccinés, l'antigène gE reste libre et les anticorps monoclonaux conjugués ajoutés par la suite se lient à l'antigène dans le

puits. L'enzyme (HRP) présente permet de catalyser le substrat ajouté, ce qui entraîne une réaction colorée. Par contre, si les anticorps anti-gE sont présents dans le sérum, c'est-à-dire de porcs infectés par le virus sauvage, ces anticorps se lient à l'antigène gE dans le puits. Ceci bloque les anticorps monoclonaux conjugués ajoutés par la suite, et les empêche de réagir avec l'antigène gE. Les anticorps monoclonaux conjugués non liés sont éliminés par la procédure de lavage subséquente, ce qui n'entraîne aucune réaction colorée lorsque l'on ajoute le substrat.

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, pipetteur 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)

Information sur les échantillons

100 µl de sérum sanguin ou de plasma est nécessaire pour chaque puits. Des sérums ou des plasmas frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

Préparation des réactifs

Tampon PBS-Tween:

Diluer 1/20 la solution concentrée de PBS-Tween dans de l'eau purifié. 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. Cuando prepare la solución tampón etc. medir el volumen requerido.
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!

Les barrettes dont l'emballage (SV-104902) est ouvert peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines au maximum.

Il y a toujours un surplus de volume pour le réactif liquide. Le volume indiqué sur l'étiquette est le minimum que l'on puisse obtenir.

Protocole

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

Courte incubation de l'échantillon:

2. Ajouter 100 µl de sérum de contrôle positif (réactif A) et 100 µl de sérum de contrôle négatif (réactif B) dans des puits sélectionnés, recouverts d'antigène de PRV. Dans un souci de confirmation, il est recommandé d'inclure les sérums de contrôle en double.
3. Ajouter 100 µl d'échantillon de sérum non dilué dans un puits sélectionné, recouvert d'antigène PRV. Dans un souci de confirmation, il est aussi recommandé d'inclure les sérums échantillons en double.
4. Sceller la plaque / barrette et incuber à 37°C pendant 1 heure. Poursuivre à partir de l'étape 8.

Incubation pendant la nuit:

5. Ajouter 25 µl de tampon de dilution d'échantillon dans tous les puits.
6. Répéter les étapes 2 et 3.
7. Sceller la plaque / barrette et incuber à température ambiante 18-25°C pendant la nuit (12-18 heures).
8. Rincer chaque plaque/barrettes 3 fois avec le tampon de PBS-Tween: Remplir les puits à chaque lavage, les vider de leur contenu et tapoter fermement la plaque retournée pour faire tomber les gouttes de liquide restantes..
9. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits sceller la plaque / barrette et incuber à 37°C pendant 30 minutes ou à température ambiante 18-25°C pendant 60 minutes.
10. Répéter l'étape 8
11. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber pendant 15 minutes à température ambiante 18-25°C. Commencer à compter une fois le premier puits rempli.
12. 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 11).

13. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm dans un spectrophotomètre de 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

1. Calculer la valeur de la densité optique moyenne (DO) pour chacun des contrôles.
2. Calculer la valeur de pourcentage de la densité optique (DOp) pour chaque échantillon et pour les sérums de contrôle positif à l'aide de la formule suivante :

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

Interprétation des résultats

Critères de validité du test

Pour garantir la validité des tests, le double des valeurs de DO de chaque puits d'un contrôle négatif ne doit pas s'écarter de plus de 25% de la valeur moyenne du duplicata. De plus, les valeurs des témoins doivent être comprises entre les limites suivantes:

DO Contrôle négatif 0,8 -1,6

DOp Contrôle positif < 30

Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, le test n'est pas valide. Pour les tests non validés, la technique peut être douteuse et l'essai doit être répété.

Interprétation des résultats

Courte incubation de l'échantillon:

1. **DOp $\leq$ 50 = positif**

Diagnostic sérologique : Infecté par le virus sauvage de la maladie d'Aujesky.

2. **DOp > 60 = négatif**

Diagnostic sérologique: Soit

a) non infecté par le virus sauvage et non vacciné contre la maladie d'Aujeszky, soit

b) non infecté par le virus sauvage mais vacciné contre la maladie d'Aujeszky avec un vaccin ne possédant pas le gène gE.

3. **DOp 51 - 60 = incertain**

Tester de nouveau l'échantillon. Si le résultat du test reste toujours incertain, prélever un nouvel échantillon sur l'animal et tester les deux échantillons en parallèle.

Incubation pendant la nuit:

1. **ODp $\leq$ 45 = positif**

Diagnostic sérologique: Infecté par le virus sauvage.

2. **ODp > 55 = négatif**

Diagnostic sérologique: Soit

a) non infecté par le virus sauvage et non vacciné contre la maladie d'Aujeszky, soit

b) non infecté par le virus sauvage mais vacciné contre la maladie d'Aujeszky avec un vaccin ne possédant pas le gène gE.

3. **ODp 46 - 55 = incertain**

Tester de nouveau l'échantillon. Si le résultat du test reste toujours incertain, prélever un nouvel échantillon sur l'animal et tester les deux échantillons en parallèle.

Pour évaluer si l'animal considéré comme négatif, est vacciné, il est recommandé d'utiliser le SVANOVIR® PRV gB-Ab test, N° d'article SV-104905/SV-104906.

Bibliographie

1. Gustafson, D.P. (1986) Pseudorabies. 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, pp. 274-289.
2. Rziha, H.-J., Döller, P.C., and Wittman, G. (1982) Detection of Aujeszky's Disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs. In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science., Vol. 17, Aujeszky's Disease. Edited by G. Wittman and S.A. Hall. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 205-214.
3. Baskerville A., Mc Ferran, J.B., and Dow, C. (1973) Aujeszky's Disease in pigs. The Vet. Bull. 43,465-480.
4. Soerensen, K.J., and Lei, J.C. (1986) Aujeszky's Disease: blocking ELISA for the detection of serum antibodies. J. Vir. Mth. 13, 171-181.



***DANGER: Solution d'arrêt (acide sulfurique).**

Peut être corrosif pour les métaux.
Provoque une irritation cutanée.

Provoque une sévère irritation des yeux.
Conserver uniquement dans le récipient d'origine P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage.

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/ un médecin. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin .

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

EN CAS D'IRRITATION CUTANÉE: consulter un médecin. Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

Titulaire de licence

INDICAL BIOSCIENCE GmbH

Deutscher Platz 5b

04103 Leipzig

Germany

www.indical.com



Indical Sweden AB

Box 1545

SE-751 45 Uppsala, Sweden

www.svanova.com

Service à la clientèle

support@indical.com

Symbols / Symbolen / Símbolos / Symboles

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

Indical Sweden AB

Box 1545
SE-751 45 Uppsala,
Sweden
www.svanova.com
support@indical.com