

Ovulation[®] test

Français	P 4
English	P 8
Espanioles	P 12
Italiano.....	P 16
Português	P 20
Protocole opératoire.....	P 23
Operating procedure	

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

FRANÇAIS

PRINCIPE

L'Ovulation Test est un test ELISA semi-quantitatif rapide sur membrane à lecture visuelle pour déterminer le taux de progestérone dans le plasma ou le sérum chez la chienne. Ce dosage vous aide à préciser le moment de l'ovulation et donc à prévoir la date de saillie ou d'insémination de la chienne. L'Ovulation Test est un excellent complément du frottis vaginal pour suivre l'évolution des chaleurs dans le temps.

INTERETS

■ DÉTERMINATION DE LA PÉRIODE FERTILE CHEZ LA CHIENNE

Les signes visuels des chaleurs (congestion vulvaire, écoulements vaginaux, attraction du mâle) ne sont que des indications approximatives qui ne suffisent pas à déterminer le moment optimal de la saillie chez la chienne. Une grande variabilité individuelle complique d'autant plus les prévisions d'insémination. Le frottis vaginal est donc indispensable pour confirmer les phases de pro-oestrus et d'oestrus.

Le pic de LH (Hormone Lutéinisante) précède toujours l'ovulation. Si on considère ce moment pour déterminer le Jour 0, on peut prévoir l'ovulation dans les 2 jours. La maturation des ovocytes dure en moyenne 2 à 3 jours après l'ovulation. Les ovocytes sont fécondables pendant 48 à 72 heures après maturation. Ainsi la période fertile se situe 5 à 6 jours après le pic LH. L'augmentation de la progestérone peut atteindre (selon les publications et les techniques de dosage) les taux de 6 à 8 ng/ml au moment de l'ovulation.

Comme le montre le graphique page 23, ci-dessous, les taux de progestérone sont bas avant l'ovulation (entre 0 et 1 ng/ml, test couleur bleu vif). Lorsque la progestérone commence à augmenter, la couleur du test change du bleu vif au bleu clair, ceci correspondant au jour du pic LH (Jour 0). La progestérone continue à augmenter les jours suivants, et la couleur du test devient bleu pâle, puis blanche.

La gestation n'est possible qu'en présence d'ovocytes fécondables (2 jours en moyenne après l'ovulation) et de spermatozoïdes vivants (5 jours en moyenne). 20% des chiennes ovulent "en dehors" de la période comprise entre le 10ème et le 14ème jour des chaleurs. Selon C. DUMON (1) seuls 2 examens associés, frottis vaginal et dosage de la progestérone, permettent de programmer saillie ou insémination et d'obtenir 95 % de succès ainsi qu'une augmentation de la prolificité.

■ AUTRES INTÉRÊTS DE L'OVULATION TEST

Détermination du moment de la mise-bas:

Lorsqu'elle est associée aux prodromes (température corporelle, présence de lait blanc, suivi échographique) une valeur de progestérone inférieure à 1 ng/ml indique que la mise-bas aura lieu dans les 24 à 48 heures.

Autres intérêts:

- Exploration des troubles de la fertilité: chaleurs silencieuses, chaleurs anovulatoires.
- Prévention des risques d'avortements par insuffisance lutéale en adaptant la supplémentation médicamenteuse.

■ AUTRES INTÉRÊTS : BOVINE, EQUINE

- contrôler le début de la gestation
- vérifier l'efficacité des traitements à base de progestagènes ou de progestatifs.

PRÉSENTATION

Kit pour 6 tests réf OV6

- | | |
|--|-----------------------|
| - 6 coupelles tests | - 1 flacon SUBSTRAT A |
| - 1 flacon SOLUTION DE LAVAGE 1 | - 1 flacon SUBSTRAT B |
| - 1 flacon SOLUTION DE LAVAGE 2 | - 1 flacon conjugué |
| - 1 flacon pour le mélange des substrats | |
| - 6 pipettes à usage unique | - 1 nuancier coloré. |

STABILITÉ – CONSERVATION

Stable 14 mois à partir de la date de fabrication. Conserver à 2-8 °C

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du kit.

RECOMMANDATIONS

■ QUAND TESTER ?

Vérifier l'exactitude du stade de pro-oestrus à l'aide d'un frottis vaginal. Le frottis vaginal vous aide à identifier l'approche du pic LH et ainsi de commencer à évaluer le taux de progestérone.

Un à deux tests sont généralement suffisants en sachant que l'ovulation se produit vers le 2ème jour après le pic LH (entre le 10ème et le 14ème jour après le début des chaleurs). La fréquence de réalisation de l'Ovulation Test sera évaluée pour chaque cas en fonction du stade des chaleurs, et des antécédents connus de l'animal.

■ PRELEVEMENTS

Prélever le sang dans un tube traité (à l' héparine ou EDTA) ou dans un tube sec (sang total). Ne pas utiliser de tube de prélèvement à gel de séparation. Ne pas utiliser de sang total. Immédiatement après la prise de sang, homogénéiser les échantillons en retournant les tubes plusieurs fois. Centrifuger l'échantillon de sang ou laisser coaguler le sang total sur tube sec à température ambiante, séparer le sérum ou le plasma dans un tube propre. L'échantillon ne doit être ni hémolysé, ni lipémique (il doit être limpide). Inscrire le nom de l'animal et la date du prélèvement sur le tube. Il est possible de conserver le sérum ou le plasma plusieurs jours au réfrigérateur (2-8°C). Pour un stockage plus long, l'échantillon doit être congelé.

■ PRECAUTIONS DE MANIPULATION

Conserver le coffret en entier au réfrigérateur lorsqu'il n'est pas utilisé. Ne pas congeler. Re-sceller toujours hermétiquement le sachet des coupelles après en avoir retiré une. Ne pas échanger les réactifs ou coupelles entre différents coffrets.

PROTOCOLE OPERATOIRE (schéma p. 23)

Avant de commencer le test, laisser les échantillons et les réactifs revenir à température ambiante (2h). Il est possible de laisser le kit à température ambiante toute la journée.

Le temps des étapes 1,3 et 7 est très important.

1 Au moyen d'une pipette, **ajouter 8 gouttes de sérum ou de plasma** au centre de la coupelle.

Attendre 2 minute.

2 **Ajouter 4 gouttes de Solution de Lavage 1** au centre de la coupelle.

Attendre que le liquide soit totalement absorbé.

Répéter 1 fois ce lavage.

3 **Ajouter 3 gouttes de conjugué** (flacon à capuchon rouge) au centre de la coupelle.

Attendre 1 minute.

4 **Remplir la coupelle avec la Solution de Lavage 2** jusqu'à la limite inférieure du bord de la coupelle, soit environ 20 gouttes.

Attendre que le liquide soit totalement absorbé.

5 **Préparer un substrat frais** dans le flacon pour le mélange des substrats (étiquette bleue):

ajouter une mesure de chaque substrat A et B (flacons à capuchons noirs) en remplissant chaque compte-gouttes jusqu'au trait noir. Bien agiter.

Il est déconseillé de préparer le substrat à l'avance car il se détériore après 30 minutes.

6 Ajouter 4 gouttes de substrat fraîchement préparé au centre de la coupelle.

Après 30 minutes, jeter toute solution inutilisée de substrat (flacon de mélange à étiquette bleue). Conserver ce flacon vidé pour les tests ultérieurs.

7 Attendre 9 minutes pour lire le résultat

Lire et enregistrer le résultat à l'aide du nuancier coloré.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les couleurs du test correspondent aux niveaux de progestérogène. Le nuancier coloré inclus dans le coffret est un guide lors de l'observation des changements de couleurs des tests réalisés.

Le tableau ci-dessous est un guide de suivis des chaleurs chez la chienne.

Couleurs	Concentration Progestérogène	Recommandations *
C1 Bleu vif	0 à 1 ng/ml	Niveau de base de la progestérogène Effectuer un nouveau test dans 2 jours.
C2 Bleu clair	1 à 2,5 ng/ml	Pic LH Effectuer un nouveau test dans les 2 jours.
C3 Bleu pâle	2,5 à 8 ng/ml	Début de la maturation des ovules Saillir ou inséminer avec du sperme frais dans 1 et 3 jours Avec du sperme congelé inséminer dans 1, 3 et 5 jours
C4 Blanc	> 8 ng/ml	Saillir ou inséminer immédiatement. Attention, vous pouvez vous trouver en fin de période fertile.

* Ces recommandations constituent un guide, aucune méthode de diagnostic ne pouvant prétendre être précise à 100%. Ainsi, le vétérinaire devra toujours tenir compte de l'historique et de l'examen clinique et/ou échographique de la chienne pour prendre une décision.

Ce test a pour but d'aider le vétérinaire praticien dans son choix thérapeutique. Cette décision est prise sous sa responsabilité. Bio Véto Test ne peut être tenu responsable des conséquences liées à une mauvaise utilisation ou une mauvaise interprétation des résultats donnés par ce test.

USE IN VITRO ONLY

ENGLISH

PRINCIPLE

The Ovulation Test is a rapid semi quantitative ELISA test on membrane with a visual reading for the determination of progesterone level in plasma or serum of dogs. It allows essentially to determine the ovulation and therefore to forecast the date of insemination or covering. Ovulation Test is an ideal complementary tool to vaginal smear examination during the heat follow up.

INTEREST

■ DETERMINATION OF THE FERTILE PERIOD :

The visible signs of heat and breeding time (such as vulval swelling, vaginal discharge, or flagging) are only an approximate indication of time of ovulation. These signs can vary by more than one week. The vaginal smear examination is necessary to confirm the oestrus or pro-oestrus stages.

The Luteinizing Hormone or LH triggers the ovulation. The day when LH increases is called Day 0. The ovulation occurs 2 days after. After ovulation, the oocytes take 2-3 days to mature, and the mature ova are alive for 48 to 72 hours. Therefore, the most fertile period for the bitch is 5-6 days after the LH peak.

According to the figure p23, the progesterone levels are low before the ovulation time (between 0 to 1 ng/ml, test bright blue). When the progesterone begins to increase, the color of the test changes from bright blue to light blue, corresponding to peak LH (day 0). Then the progesterone continues to increase the following days and the test color becomes faint blue, then white.

The pregnancy is only possible with mature ova (2 days after ovulation) and with alive sperm (5 days +/- 2). 20% of dog shows ovulation outside the period between the 10th and 14th days of heat. According to C. DUMONT (1) only two associated examinations, vaginal smears and detection of progesterone level, allow to schedule insemination or covering and to reach 95% of success with an increasing of prolificity.

■ ANOTHER INTEREST FOR DOGS :

Determination of the whelping date :

When it is used in conjunction with all other available information such as drop of rectal temperature, white milk, ultrasound examination and others, level of progesterone lower than 1 ng/ml indicates a readiness for delivery within 24 hours or 48 hours.

Another interests :

- Follow up of fertility treatment
- Preventing abortion due to luteal insufficiency by controlling the effect of adapted treatment.

■ ANOTHER INTEREST FOR BOVINE, EQUINE :

- Early pregnancy status
- Efficiency of progestagens or progestative treatment

PRESENTATION

6 tests / kit:	6 unitary test cups	1 vial of SUBSTRATE A
	6 transfer pipettes	1 vial of SUBSTRATE B
	1 vial of WASH SOLUTION 1	1 vial of Substrate Mixing Bottle
	1 vial of WASH SOLUTION 2	1 vial of Conjugate
	1 colour guide	1 pack insert

STABILITY – STORAGE

Store at 2-8°C. DO NOT FREEZE

Shelf Life : 14 months from the manufacturing date written on the box

RECOMMENDATION

■ WHEN TO TEST :

Generally 1 or 2 tests are enough if the first day of the appearance of pro-estrus is known (vaginal bleeding). The vaginal cytology can be used like a guide in order to identify the approach of LH peak and then to determine the progesterone level.

For particular cases, like infertility problem or non-regular cycle, it is recommended to tests starting from the 4th day during pro-estrus and to continue until insemination by testing every 2 days.

■ SAMPLING :

·Collect the blood sample into an EDTA or Heparin coated tube or in a dry tube. Do not use tube with serum separator gel. Do not use whole blood.

·Immediately after collection, invert the tube many times to mix it. Spin the blood down with a centrifuge or let the blood clot by staying at room temperature (2 hour) and pour the serum into a clean glass tube.

Do not use hemolysed or lipemic serum.

If the sample is not immediately used, store the sample at the fridge (2-8°C). For a long

storage, the serum or plasma should be frozen.
Label the sample.

■ **PRECAUTIONS OF USE :**

Always reseal the plastic bag after removing a test cup.
Do not exchange the test cups or the reagents from one box to another

PROCEDURE (fig. p. 23)

Take the kit out from the refrigerator at least 2 hours before using a test, in order to allow the reagents to come at room temperature. It is also possible to leave the kit a room temperature along the day.

Timing the steps 1,3 and 7 is very important.

1 With a transfer pipette, **add 8 drops of sample** to the center of the cup.
Wait 2 minutes.

2 **Add 4 drops of Wash solution 1.** Wait for the liquid to drain completely into the cup.
Repeat this step 1 time.

3 **Add 3 drops of conjugate** (red cap bottle) to the center of the cup.
Wait 1 minute.

4 **Fill the cup to the top of inner line with the Wash solution 2,** for about 20 drops.
Wait for the liquid to drain completely into cup.

5 **Prepare a fresh substrate solution** using the empty mixing bottle (blue label bottle): add one volume of each substrate A and substrate B bottles by filling their droppers up to the line. Homogenize by shaking the freshly prepared substrate.

6 **Add 4 drops of the freshly prepared substrate bottle** (blue label bottle) to the center of the cup.
Discard any unused freshly prepared substrate solution after 30 minutes as it becomes rapidly unstable.

7 **Wait 9 minutes.** Read and record the result, with the help of the colour guide.

INTERPRETATION OF RESULTS

The colour result is corresponding to the level of progesterone. Use the enclosed colour guide for evaluating and recording the result.

The following table is a guide of interpretation for the follow up of the fertile period in dog female

Color	Progesterone Level	Interpretation*
C1 Bright Blue	0 to 1 ng / ml	Baseline progesterone level. Test again every 2 days until getting a light blue colour result.
C2 Light Blue	1 to 2,5 ng / ml	LH peak Test again every 2 days in case of suspected cycle troubles.
C3 Faint Blue	2,5 to 8 ng / ml	The eggs begin to ripen after ovulation. Mate or inseminate in 1 and 3 days (and 5 days with frozen semen).
C4 White	> 8 ng / ml	Mate or Inseminate immediately. Caution: may be the fertile period is ended.

* The recommended actions above are a guideline, as no test is 100% accurate in all times and under all conditions. Therefore, the veterinarian should interpret all test result in light of the patient's clinical and/or ultrasonic examination, and historical information. This kit is intended to help the practitioner in the choice of treatment. This is the veterinarian's prerogative and responsibility. Bio Veto Test can not be held responsible for the consequences of misuse or misinterpretation of the results given by the test.

PARA USO IN VITRO

ESPAÑOL

PRINCIPIO

El BVT Ovulation Test es un procedimiento semi-cuantitativo rápido que se basa en la técnica ELISA en membrana. Mediante la lectura visual se puede determinar el nivel de progesterona en plasma o suero de perros, gatos, bovinos y equinos. El Ovulation Test está indicado fundamentalmente para determinar la ovulación y consecuentemente el momento indicado para la inseminación o apareamiento.

RECOMENDACIONES DE USO

■ DETERMINACIÓN DEL PERÍODO FÉRTIL EN PERRAS

Los signos visibles del estro (hinchazón de la vulva, fin de la descarga vaginal) son sólo indicadores aproximados del momento de la ovulación. Estos signos pueden variar en más de una semana en relación con el momento de la ovulación.

La ovulación se produce por efecto de la hormona luteinizante (LH). El día en que la LH aumenta es el día 0. La ovulación tiene lugar 2 días después de este pico de LH. Después de producida la ovulación, los ovocitos necesitan de 2 a 3 días para madurar, y los óvulos maduros viven de 48 a 72 horas. Por lo tanto, el período de mayor fertilidad en la perra será en los días 5 y 6 después del aumento de la LH. El aumento en los niveles de progesterona corresponden con el pico de LH, por lo tanto su dosaje nos permitirá precisar el momento de la ovulación con relativa exactitud. Tal como lo muestra el gráfico página 24, los niveles de progesterona son bajos antes de la ovulación (entre 0 y 1 ng/ml, test de color azul brillante). Cuando la progesterona comienza a aumentar, el color del test cambia del azul brillante al azul claro, y esto corresponde al día del pico de LH (día 0). La progesterona sigue aumentando los días siguientes, y el color del test se vuelve azul pálido, luego blanco.

La preñez solo será posible si los óvulos están maduros (2 días después de la ovulación) y el espermia viable (5 días \pm 2). En el 20 % de las perras la ovulación se produce fuera del período comprendido entre los días 10 y 14 a partir del inicio del celo.

El primer día del celo no es preciso y la aceptación del macho no coincide necesariamente con el período fértil. De acuerdo con C. Dumont (1) únicamente dos determinaciones asociadas : frotis vaginal y test de progesterona, sirven para programar la inseminación y obtener un 95 % de éxito con un aumento de la prolificidad.

■ OTROS USOS DEL BVT OVULATION TEST

Detección de ciclos sin ovulación: la progesterona queda baja

Detección de cuerpos lúteos quísticos: la progesterona queda alta

Detección de la ovulación en perras que presentan celos silenciosos

Determinación de la fecha de parto: La disminución del nivel sérico de progesterona a niveles inferiores a 1 ng/ml, en una perra cuyo período de gestación está llegando al fin, nos indica que el parto ocurrirá en 24 a 48 horas. De acuerdo a C.Dumont (1) y A.Fontbonne (2), la determinación del nivel de progesterona, aumenta las posibilidades de éxito en una cesárea. (mayor posibilidad de supervivencia).

Tratamientos con progestágenos: El BVT Ovulation Test sólo detecta la progesterona de origen natural y permite entonces seguir la eficacia de un tratamiento con progestágenos.

Uso en gatas: El BVT Ovulation Test puede ser utilizado en gatas para confirmar un aumento en el nivel de progesterona, inducido por el contacto con un macho o por la presencia de quistes de ovario.

Vacas, yeguas: El BVT Ovulation Test puede ser utilizado para monitorear el ciclo de la progesterona y controlar la eficacia de tratamientos que incluyan prostaglandinas o progestágenos. También se puede utilizar para confirmar la preñez.

PRESENTACIÓN

6 test / kit:	6 pocillos individuales	1 vial de SUSTRATO A
	6 pipetas desechables	1 vial de SUSTRATO B
	1 vial de SOLUCIÓN DE LAVADO 1	1 vial para la mezcla de sustratos
	1 vial de SOLUCIÓN DE LAVADO 2	1 vial de conjugado
	1 guía de colores	1 inserto

ESTABILIDAD CONSERVACIÓN

Conservar en el refrigerador (2-8°C). **NO CONGELAR**

El kit es estable durante 14 meses a partir de la fecha de fabricación. La fecha de caducidad figura en la caja del kit.

Los pocillos que no se utilicen deben conservarse en la bolsa cerrada.

RECOMENDACIONES

■ CUANDO UTILIZARLO?

Uno o dos tests son generalmente suficientes, si tenemos en cuenta que la fecha de ovulación (día 2) se produce en general entre los días 11 y 13 a partir del inicio del proestro (secreción vaginal).

La citología vaginal puede ser utilizada como una guía para poder saber la proximidad del pico de LH y entonces comenzar a utilizar el test de progesterona.

Para casos particulares (problemas de fertilidad, etc.) es recomendable estimar el nivel de progesterona a partir del 4º día de proestro, y continuar hasta la inseminación.

PRECAUCIÓN

■ NO UTILICE SANGRE ENTERA

- El tiempo en los pasos 1, 3 y 7 es muy importante.
- No mezcle componentes de distintos lotes.
- Si desea realizar un control de calidad del kit puede realizar los pasos del 2 al 7. El resultado debe ser azul brillante.

■ MUESTRAS

Obtenga las muestras de sangre en tubos con EDTA o heparina, o en tubos secos. Inmediatamente después de la obtención, invierta el tubo varias veces para mezclar. Obtenga la muestra por centrifugación o dejando el tubo en reposo durante 1/2 - 1 hora y coloque el suero en un tubo de vidrio limpio.

Si la muestra no es analizada inmediatamente, consérvela en el frigorífico.

Para la conservación durante un largo período se debe congelar.

Etiquete la muestra con el nombre, fecha y día del ciclo.

No utilice sangre entera.

PROCEDIMIENTO (fig. p. 23)

Saque el kit del refrigerador por lo menos 2 horas antes de utilizarlo para que alcance la temperatura ambiente. **Es posible dejar el kit a temperatura ambiente durante la noche.**

NO UTILICE SANGRE ENTERA

- 1 **Con una pipeta de transferencia agregue 8 gotas** de muestra en el centro del pocillo. **Espera 2 (dos) minutos. *El tiempo en este paso es muy importante.***
- 2 **Agregue 4 gotas de solución de lavado al pocillo.** Espere a que el líquido sea absorbido completamente por el pocillo. **Repita este paso 1 vez**
- 3 **Agregue 3 gotas de conjugado del vial rojo** en el centro del pocillo. Espere 1 (un) minuto. ***El tiempo en este paso es muy importante.***
- 4 **Llene el pocillo** hasta el tope de la línea interior **con solución de lavado 2**, aproximadamente 20 gotas. Espere a que el líquido sea absorbido completamente por el pocillo.
- 5 **Prepare la solución de sustrato** en el vial vacío con la etiqueta azul, mezclando 1 gotero (hasta la marca) de cada uno de los viales de sustrato (A y B). Mezcle por agitación. *
- 6 **Agregue 4 gotas de sustrato fresco** (vial con la etiqueta azul) en el centro del pocillo.*
- 7 **Espera 9 minutos**, lea el resultado y regístrelo con la guía de colores.
(azul brillante = C1; azul claro = C2; azul pálido = C3; blanco=C4).

*** Atención: Después de 30 minutos de preparado el sustrato deberá ser desechado, y se debe preservar el vial vacío para nuevos tests.**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El color resultante se corresponde con los niveles de progesterona. Utilice la carta de colores como una guía para evaluar los resultados.

Color	Nivel de Progesterona	Interpretación*
C1 Azul brillante	0 a 1 ng / ml	Nivel basal de progesterona. Vuelva a ensayar a los 2 días.
C2 Azul claro	1 a 2,5 ng / ml	Pico de LH. Vuelva a ensayar a los 2 días.
C3 Azul pálido	2,5 a 8 ng / ml	Los óvulos están madurando. Insemine o cubra en 1 y 3 días. Si va a utilizar semen congelado, insemine en 1, 3 y 5 días.
C4 Blanco	> 8 ng / ml	Insemine o cubra inmediatamente. Atención, es posible que se encuentre al final del período fértil.

* Las acciones recomendadas anteriormente son sólo una guía, ya que ningún ensayo es 100% preciso todo el tiempo y en todas las condiciones. Por lo tanto, el veterinario deberá interpretar el resultado tomando en cuenta la exploración clínica y el historial del paciente.

El ensayo tiene como finalidad ayudar al veterinario en la determinación del nivel de progesterona. El diagnóstico definitivo es una prerrogativa y responsabilidad del profesional actuante. Bio Veto Test no se puede responsabilizar de las consecuencias del mal uso o error en la interpretación de los resultados obtenidos con el ensayo.

RISERVATO ALL'UTILIZZO IN VITRO

ITALIANO

PRINCIPIO

Ovulation test è un test ELISA semiquantitativo rapido su membrana a lettura visuale per la determinazione dei livelli di progesterone nel plasma o nel siero di cane. L'Ovulation test permette soprattutto di precisare il momento dell'ovulazione e quindi di programmare la data del salto o dell'inseminazione della cagna.

INTERESSE

■ DETERMINAZIONE DEL PERIODO DI FERTILITÀ

I segni visivi dei calori e del momento della riproduzione (rigonfiamento vulvare, termine delle perdite vaginali) sono solo una indicazione approssimativa del momento dell'ovulazione. Questi stessi segni possono variare di una o più settimane. Il segno più affidabile di ovulazione è l'improvviso aumento dell'ormone luteinizzante (LH) che fa partire l'ovulazione. Il giorno in cui aumenta LH è detto giorno 0. L'ovulazione avviene due giorni dopo questo picco di LH. Dopo l'ovulazione, gli ovuli maturano in 2-3 giorni e gli ovuli maturi vivono per 48-72 ore. Quindi il periodo più fertile per la cagna è 5-6 giorni dopo l'aumento di LH. L'aumento del progesterone corrisponde al picco di LH, che è quello che permette di identificare con precisione l'ovulazione. Come mostra il grafico pagina 24, i tassi di progesterone sono bassi prima dell'ovulazione (tra 0 e 1 ng/ml; il test mostra un colore blu intenso). Quando il progesterone comincia ad aumentare, il colore del test vira dal blu intenso al blu chiaro, che corrisponde al picco di LH (giorno 0). Il progesterone continua ad aumentare i giorni successivi ed il colore del test diventa blu pallido e poi bianco. La gestazione è possibile solo in presenza di un ovulo fecondabile (2 giorni dopo l'ovulazione) e di spermatozoi vivi (5 giorni + 2). Il 20% delle cagne ovula fuori dal periodo compreso tra il 10° e il 14° giorno di calore. Il primo giorno del calore non è preciso e l'accettazione del maschio non è automaticamente sovrapponibile al periodo di fecondità. Secondo C. Dumon (1) solo due esami associati, striscio vaginale e dosaggio del progesterone, permettono di programmare il salto o l'inseminazione e di ottenere il 95% di successo oltre ad un aumento della proflitticità.

■ ALTRI INTERESSI DELL'OVULATION TEST

Determinazione del momento del parto

La caduta del progesterone ad un tasso inferiore a 1 ng/ml, associata ai segni (temperatura corporea, presenza di latte bianco, seguimento ecografico), in una cagna quasi a termine indica che il parto avverrà entro 24-48 ore.

Altri interessi :

- Esplorazione della fertilità : calori silenti, cicli non ovulatori.
- Prevenzione dei rischi di fallimento causati da un insufficienza luteale adattando il trattamento medica.

Altri interessi : Bovini, Cavalli :

- Controllo del inizio della gestazione.
- Controllo dell' efficacia dei trattamenti con progestinici.

PRESENTAZIONE

Kit per 6 tests	6 cilindri test	1 flacone SUBSTRATO A
Réf. OV6 -	1 flacone SOLUZIONE DI LAVAGGIO 1	1 flacone SUBSTRATO B
	1 flacone SOLUZIONE DI LAVAGGIO 2	1 flacone di conjugato
	1 flacone per mescolare i substrati	1 legenda dei colori di riferimento
	6 pipette monouso	

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Conservazione in frigorifero (2-8 °C). Stabile 14 mesi a partire dalla data di fabbricazione.

La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit.

Richiudere sempre la confezione dopo aver preso un test.

PRECAUZIONI

■ QUANDO TESTARE

- Normalmente sono sufficienti da uno a due tests per stabilire che l'ovulazione (giorno 2) avverrà dall'11° al 13° giorno dopo l'inizio del pro-estro caratterizzato dalla comparsa delle prime perdite. La citologia vaginale può essere usata come guida per identificare l'ap-proccio al picco di LH così come per cominciare a valutare il progesterone.

- Per tutti i casi particolari (problemi di fertilità, inseminazioni importanti, ...) si consiglia di valutare il tasso a partire dal 4° giorno di pro-estro e di continuare fino all'inseminazione con un test ogni due giorni.

■ ALTRE RACCOMANDAZIONI

- Conservare la confezione in frigorifero fino al momento dell'utilizzo. Non congelare.

- NON USARE SANGUE INTERO

- Richiudere ogni volta la confezione dopo aver preso un test.

- Sono importanti i tempi delle tappe 1, 3 e 7.

- Non cambiare mai i reattivi o i cilindri-tests di confezioni diverse.

Se volete fare un controllo della procedura, eseguite solo le tappe da 2 a 7 senza aggiungere il campione. Il colore ottenuto deve essere blu intenso.

CAMPIONI

Prelevare il sangue e metterlo in una provetta con anticoagulante (eparina o EDTA) o in una provetta secca (sangue intero). Immediatamente dopo il prelievo, omogeneizzare il campione ruotando la provetta più volte. Centrifugare il campione di sangue o lasciare coagulare il sangue intero nella provetta a secco a temperatura ambiente, separare il siero o il plasma in una provetta apposta. Scrivere il nome dell'animale e la data del prelievo sulla provetta. È possibile conservare il siero o il plasma più giorni in frigorifero. Per uno stoccaggio più lungo, il campione deve essere congelato. Non usare sangue intero.

PROTOCOLLO OPERATIVO (fig. p. 23)

Prima di iniziare il test, portare a temperatura ambiente il campione e i reagenti (2 ore). Si può anche lasciare il kit a temperatura ambiente per una giornata.

1 Con l'aiuto della pipetta, aggiungere 8 gocce di siero o plasma al centro della coppa-test. **ASPETTARE 2 MINUTI.**

2 Aggiungere 4 gocce di soluzione di lavaggio 1 al centro della coppa-test; aspettare che il liquido sia totalmente assorbito.

Ripetere un altro lavaggio.

3 Aggiungere al centro della coppa-test 3 gocce di conjugato del flacone con il tappo rosso. **ASPETTARE 1 MINUTO.**

È importante rispettare i tempi indicati.

4 Riempire la coppa-test con la soluzione di lavaggio 2 fino al limite inferiore (più o meno 20 gocce). Aspettare che il liquido sia completamente assorbito.

5 Preparare il substrato fresco nel flacone vuoto con l'etichetta blu mescolando una misura (riempire fino al livello nero) di ognuno dei substrati A e B (flacone con tappo nero).

Agitare bene. Si sconsiglia di preparare il substrato prima perché si deteriora in 30 minuti.

- 6 Aggiungere infine 4 gocce di questa soluzione appena preparata al centro del test. Dopo 30 minuti, buttare la soluzione preparata nel flacone di mescolamento con l'etichetta blu.

Conservare il flacone per successivi tests.

- 7 ASPETTARE 9 MINUTI. Leggere e registrare il risultato con l'aiuto della legenda dei colori (blu intenso = C1; blu chiaro = C2; blu pallido = C3; bianco = C4).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I colori del test corrispondono ai livelli di progesterone. Il diagramma dei colori incluso è una guida per l'osservazione dei cambiamenti di colore.

Colori	Concentrazione Progesterone	Raccomandazioni*
C1 Blu	0-1 ng/ml	Livello base di progesterone; eseguire un nuovo test fra 2 giorni.
C2 Blu Chiaro	1-2,5 ng/ml	Picco di LH. eseguire un nuovo test fra 2 giorni.
C3 Blu Pallido	2,5-8 ng/ml	Inizio di maturazione degli ovuli; salto o inseminazione con sperma fresco dopo 1 e 3 giorni; con sperma congelato inseminare dopo 1, 3 e 5 gg.
C4 bianco	> 8 ng/ml	Salto o inseminazione immediata; attenzione perché potreste anche essere alla fine del periodo fertile.

* Queste raccomandazioni costituiscono una guida. Nessuno metodo di diagnosi può pretendere di essere precisa al 100%. Quindi, il veterinario dovrà tenere sempre conto del cronostoria e dell'esame clinico dell'animale prima di prendere una decisione.

Questo test ha lo scopo di aiutare il veterinario nella determinazione dei livelli di progesterone. La diagnosi finale e al responsabilità resta però comunque sempre del veterinario che esercita. Bio Veto Test non può essere tenuta responsabile delle conseguenze legate ad una errato utilizzo o di una mal interpretazione dei risultati dati dal test stesso.

SÓ PARA USO IN VITRO

PORTUGUES

FUNDAMENTO

O Ovulation Test é um teste do tipo ELISA rápido e semiqualitativo em membrana para a determinação dos níveis de progesterona em soro ou plasma em cães e gatos. Permite essencialmente predeterminar o momento da ovulação, e assim prever a data ideal para o acasalamento ou a inseminação. Pode igualmente ser utilizado, para determinar os níveis de progesterona na vaca e na égua (protocolos enviados a pedido).

OBJETIVOS

■ DETERMINAÇÃO DO PERÍODO FÉRTIL:

Os sinais visuais do cio e da receptividade para acasalamento tais como (edema vulvar, fim do corrimento vaginal) são unicamente aproximativos como indicadores do momento da ovulação. Estes sinais podem diferir entre eles mais de uma semana.

O sinal mais fiável da iminência da ovulação, é o súbito aumento da hormona luteinizante(LH). O dia em que a LH atinge o pico é chamado dia 0. A ovulação ocorre 2 dias depois. Após a ovulação, os oócitos amadurecem em 2-3 dias, e os ovulos maduros permanecem viáveis durante 48-72 horas. Assim, o período mais fértil para a cadela situase entre os 5-6 dias após o pico da LH.

Como se pode verificar no gráfico P24, os níveis de progesterona são baixos antes da ovulação (entre 0 e 1 ng/ml, teste com a coloração azul vivo). Logo que a progesterona começa a aumentar, a coloração do teste muda do azul vivo para o azul claro, o que corresponde no dia do pico LH (dia 0). Nos dias seguintes a progesterona continua a aumentar e a coloração do teste torna-se azul pálido e depois branca.

A gravidez só é possível na presença de ovulos maduros (2 dias após a ovulação) e de esperma viável (5 dias +/- 2). 20% das cadelas ovulam fora do período compreendido entre o 10º e o 14º dias do cio. O primeiro dia do cio não é constante a receptividade ao macho nem sempre coincide com o período fértil. Segundo C. DUMONT (1) **só a associação de dois exames, esfregaço vaginal e doseamento da progesterona**, permitem programar a inseminação ou o acasalamento garantindo **uma taxa de sucesso de 95%, com o respec-**

tivo aumento da prolificidade.

■ OUTROS OBJECTIVOS PARA O OVULATION TEST:

Detecção de quistos lúteos: o nível de progesterona permanece alto.

Detecção de ciclos anovulatórios: a progesterona permanece baixa.

Detecção de ovulação em cadelas comaios silenciosos.

Determinação do momento do parto ou da decisão cirúrgica em caso de cesariana: a queda da progesterona para um valor inferior a 1 ng/ml numa cadela a termo, é indicativo de que o parto terá início nas 24 a 48 H seguintes. .

Segundo C. DUMONT (1) e A. FONTBONNE (2) a determinação dos níveis de progesterona aumenta a percentagem de viabilidade dos fetos nascidos de cesariana.

Tratamentos de fertilidade: O Ovulation Test detecta unicamente a progesterona natural. Permite por isso seguir a eficácia de um tratamento por prostagéneos

Determinação do momento da I.V.G.: O nível de progesterona deve estar inferior a 2ng/ml. Ovulation Test permite o acompanhamento de um tratamento, nomeadamente com prostaglandinas.

Na gata: Ovulation Test pode ser utilizado para confirmar o contacto com um macho ou a presença de quistos ovários (o nível de progesterona estará aumentado).

APRESENTAÇÃO

Kit / 6 testes:	6 cupulas de teste	1 frasco SUBSTRATO A
Ref: OV6	6 pipêtas individuais	1 frasco SUBSTRATO B
	1 frasco SOLUÇÃO LAVAGEM 1	1 frasco de mistura de substratos A+B
	1 frasco SOLUÇÃO LAVAGEM 2	1 frasco de Enzima conjugado
	1 guia colorido	1 literatura de instruções

ESTABILIDADE – ARMAZENAMENTO

Armazenar entre (2-8°C). **NÃO CONGELAR.** Validade: 14 meses após a data de fabrico (marcada sobre o Kit). Mantenha sempre o saco herméticamente fechado após remover cada cupúla de teste.

RECOMENDAÇÕES

■ QUANDO TESTAR:

Geralmente 1 ou 2 testes são suficientes desde que se conheça o primeiro dia do pro-estro (corrimento vaginal). A citologia vaginal pode ser usada como um guia de forma a identificar a proximidade do pico de LH e só então executar o Ovulation Test.

Casos particulares ; como problemas de infertilidade ou ciclos irregulares, recomenda-se testar desde o 4º dia do pro-estro e continuar até á inseminação testando cada 2 dias.

■ ATENÇÃO

NÃO USAR SANGUE TOTAL.

É muito **importante** respeitar o tempo de execução das **etapas 1, 3 e 7**

Não permutar os componentes entre diferentes kits.

É possível efectuar um Controlo de Qualidade executando unicamente as etapas 2 a 7 (sem adicionar a amostra). O resultado deverá ser de cor **Azul Vivo**.

RECOLHA DA AMOSTRA

Recolha o sangue num tubo com EDTA/ Heparina ou num tubo seco e limpo.

Imediatamente após a recolha, inverta o tubo várias vezes para homogeneização.

Centrifugue o sangue (EDTA/Heparina) ou deixe formar o coágulo á temperatura ambiente (1 hora) seguidamente transfira o soro para um tubo de vidro limpo.

Se a amostra não for imediatamente testada, armazene-a no frigorífico (até 3 ou 4 dias).

Para períodos superiores de armazenamento, o soro ou o plasma deve ser congelado.

Identifique a amostra de forma visível.

PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO (fig. p. 23)

Antes de iniciar o teste, deixe a amostra e os diferentes componentes atingir a temperatura ambiente (2h). É possível guardar os componentes do kit á temperatura ambiente durante o dia.

NÃO USE SANGUE TOTAL

- 1 Com auxílio de uma pipêta, **adicione 8 gotas da amostra** no centro da cúpula. **AGUARDE 2 (dois) MINUTOS. Este intervalo de tempo é importante.**
- 2 **ADICIONE 4 (quatro) gotas da Solução de Lavagem 1.**
Aguarde até que o líquido seja completamente absorvido pela almofada. Repita esta etapa mais uma vez.
- 3 **ADICIONE 3 (três) gotas do conjugato** frasco de tampa vermelha no centro da cúpula e **AGUARDE 1 (um) MINUTO. Este intervalo de tempo é importante.**
- 4 **Encha a cúpula** até ao limite inferior com a **Solução de Lavagem 2** (20 gotas do frasco). **AGUARDE** até que o líquido seja completamente absorvido.
- 5 Prepare uma solução de **Substrato fresca** no frasco misturador com o rótulo azul usando para esse fim o doseador (cheio até á linha negra) com respectivamente o Substrato A e o Substrato B. De seguida agite bem a mistura. Não preparar antecipadamente.
- 6 **ADICIONE 4 (quatro) gotas da solução fresca de substrato A+B (rótulo azul)** no centro da cúpula*.
- 7 **AGUARDE 9 (nove) MINUTOS.** Leia e registe o resultado (comparativamente com a escala colorimétrica fornecida no teste):

Azul vivo = C1 Azul claro = C2 Azul pálido = C3 Branco = C4

* Atenção: Após 30 minutos, deitar fora a solução preparada e não utilizada no frasco de tampa azul. Este frasco depois de seco e limpo servirá na preparação de outros testes.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A coloração resultante corresponde ao nível de progesterona. Utilize o guia incluso para avaliar e registar os resultados

COLORAÇÃO	NÍVEL DE PROGESTERONA	INTERPRETAÇÃO*
C1 Azul Vivo	0 a 1 ng / ml	Nível basal de progesterona. Testar de novo cada 2 dias, até obter um resultado de cor Azul Claro.
C2 Azul Claro	1 a 2,5 ng / ml	Pico de LH Acasalar ou inseminar no 3º e 5º dias seguintes (e tbm no 7º caso se utilize semen congelado). Perante suspeita de ciclos irregulares, testar novamente cada 2 dias.
C3 Azul Pálido	2,5 a 8 ng / ml	Os ovulos começam a amadurecer após a ovulação. Acasalar ou inseminar no 1º e 3º (e 5 dias com semen congelado) dias que se seguem.
C4 Branco	> 8 ng / ml	Acasalar ou inseminar imediatamente. Atenção: talvez o período fértil já tenha terminado.

Estas recomendações constituem unicamente um guia, sabendo que nenhum método de diagnóstico é 100% preciso. Deste modo, recomenda-se que o médico veterinário no momento de tomar uma decisão, para além do resultado do teste de diagnóstico, tome sempre em linha de conta a anamnese assim como o exame clinico do animal.

Este teste tem como objectivo auxiliar o 'médico veterinário no determinação dos níveis de progesterona. O diagnóstico final será sempre uma prerrogativa e uma responsabilidade exclusiva do médico veterinário. A Bio Vetot Test descarta toda e qualquer responsabilidade pelas consequências inerentes a uma utilização indevida ou a uma deficiente interpretação deverá ter sempre em linha de conta a história clinica da cadela.

BIBLIOGRAPHIES

- (1) C. DUMONT : "Vaginal smears and progesterone levels : practical applications" 1^{eres} journées CNVSPA-SNGTV - Joué les Tours France 3-5 Juin 1994.
- (2) A. FONTBONNE : "Use of progesterone level determination in bitch". Les indispensables de l'animal de compagnie - Reproduction du chat et du chien 1992, Editions PMCAC Paris 17, 53-58
- (3) TAINURIER (D.), CHOQUART (V.), FIENI (F.), BRUYAS (J.F.) et BATTUT (I.) : Le suivi de la gestation chez la chienne. Rec. Med. Vet. 1998, 174, 3/4, 77-83.

PROTOCOLE OPERATOIRE

1



2 mn

2



3



1 mn

8 $\text{\textcircled{D}}$ Serum / Plasma

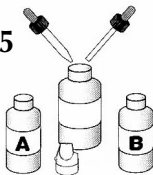
4 $\text{\textcircled{D}}$ + 4 $\text{\textcircled{D}}$ Solution 1

3 $\text{\textcircled{D}}$ Enzyme

4



5



6



20 $\text{\textcircled{D}}$ Solution 2

Substrat A + Substrat B

4 $\text{\textcircled{D}}$ Substrat A + B

7

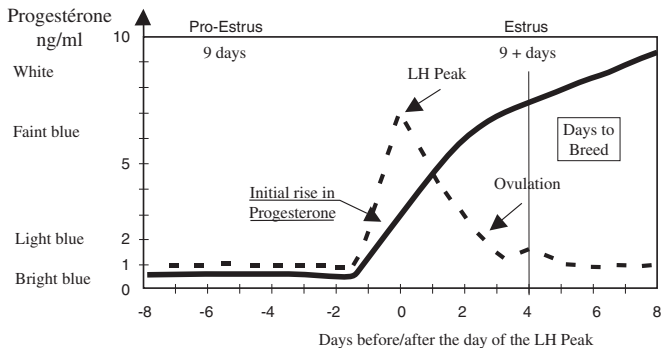


Attendre
Wait
Espere



9 mn

Aspettare
Aguardar



BIO VETO TEST
285, AVENUE DE ROME
83500 LA SEYNE SUR MER - FRANCE
TEL. +33 (0)4 94 10 58 94 - FAX +33 (0)4 94 10 58 90
WEB : www.bvt.fr - E-MAIL : bvt@bvt.fr



La Biologie au Service du Vétérinaire

