

SERELISA[®] Rabies Ab Mono Indirect

KIT POUR LA DETECTION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE
VIRUS DE LA RAGE
DANS LE SERUM INDIVIDUEL DE CHIEN OU DE CHAT

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

192 REACTIONS MONOCUPULES

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit Serelisa[®] Rabies Ab mono indirect permet la détection quantitative d'anticorps dirigés contre le virus de la rage à partir de sérum de chien ou de chat. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, une concentration minimale en anticorps de 0.5 UI/ml est nécessaire pour protéger contre la rage (WHO, 1992. Expert Committee on Rabies, 8th Report. World Health Organization, Geneva, Technical Report Series n°824). La réaction comporte trois étapes :

1. Chaque échantillon de sérum est déposé dans un puits préalablement sensibilisé par le virus de la rage inactivé. Les anticorps présents dans les échantillons se fixent sur l'antigène viral coaté au fond du puits.

2. Après lavage, un conjugué Protéine A couplée à la Peroxydase permet de révéler la fixation des Immunoglobulines (Anticorps) formant le complexe :

(Ag rage) - (Ac anti rage) - (Protéine A/ peroxydase)

3. L'excès de conjugué est éliminé par une étape de lavages. L'enzyme liée au complexe est révélée par l'adjonction d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction, les densités optiques sont mesurées. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues à partir du témoin positif.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
6 Barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par l'antigène de la rage	Utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué : Protéine A / peroxydase (CJ) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant du conjugué et utiliser dans les 24 heures après dilution
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi
Témoin négatif (N) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant des échantillons et utiliser dans les 24 heures après dilution
Témoin positif (P) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant des échantillons et utiliser dans les 24 heures après dilution
Diluant des échantillons (SD)	Prêt à l'emploi
Solution de lavage (W) (10 fois concentrée)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48 heures après dilution.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi
Film adhésif	6 films

NB : Les réactifs dilués doivent être conservés à +5°C ± 3°C et utilisés dans les délais indiqués ci-dessus.

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Sérum de référence OIE
- Eau distillée ou déminéralisée.
- Pipettes réglables, ou fixes, pour mesurer et délivrer de 0 à 1000 µl. L'erreur de la mesure doit être ≤ 10% pour des volumes ≤ 10 µl et ≤ 5% pour tous les autres volumes indiqués.
- Epruvettes graduées de 100 ml et 1000 ml.
- Dispositif de lavage, de préférence automatique pour plaques de microtitration.
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres pour lecture bichromatique à 450 et 630 nm. Il est toutefois possible d'utiliser un lecteur monochromatique équipé d'un filtre à 450 nm.
- Incubateur à +37°C ± 3°C.

IV. PRECAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend du respect du mode opératoire (cf. paragraphe VI) et des bonnes pratiques de laboratoire.

1. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lots différents
2. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.
3. Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 1 heure avant utilisation.
4. Manipuler réactifs et échantillons comme des produits à risques.
5. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau froide les parties exposées.
6. Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
7. Eviter les contaminations inter-échantillons lors du prélèvement, du stockage ou du transport. Il est nécessaire de changer d'embout de pipette pour chaque échantillon.
8. Ne pas contaminer la solution substrat par des ions métalliques, des oxydants, des détergents. Veiller à la propreté des récipients. Ne pas utiliser le même récipient ou le même embout de pipette pour le conjugué et le substrat.
9. Il est conseillé d'éliminer les réactifs et matériels en contact avec les réactifs selon les exigences réglementaires. Les fiches de sécurité du produit sont disponibles sur demande.

Phrases de risques :

R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.

R35 : Provoque de graves brûlures.

R 36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.

R 41 : Risque de lésions oculaires graves.

R 42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau.

S 7 : Conserver le récipient bien fermé.

S 24 : Eviter le contact avec la peau.

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S30 : Ne jamais verser de l'eau dans le produit.

S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Le test est réalisé sur sérum inactivé (30 min. + 56°C) dilué au 1/100. Une gamme de dilutions de sérum standard OIE (contenant 6,7 IU/ml) est nécessaire.

Ce sérum standard est fourni par le laboratoire de Référence OIE pour la Rage, Nancy, France.

Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérum	max. 7 j.	Oui	Non

VI. MODE OPERATOIRE

Suivre le mode opératoire. Distribuer les témoins négatif et positif en double pour chaque série de déterminations et au minimum pour chaque plaque.

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Préparer les échantillons qui vont être testés. Les dilutions seront effectuées dans le diluant des échantillons du kit (SD).

Les dilutions seront préparées comme suit :

les échantillons sont pré-dilués au 1/10 dans des microtubes (10 µl d'échantillon dans 90 µl de SD)

3. Pour la titration des sérums, une gamme de 7 dilutions du sérum standard OIE doit être réalisée dans des tubes ou dans des plaques, à partir de dilutions au 1/10, puis au 1/30, 1/100, 1/150, 1/300, 1/1000 et 1/3000.

La préparation de la gamme de dilution du sérum standard OIE doit être la suivante :

Pré-dilution OIE	Préparation
1/10	10 µl OIE + 90 µl diluant des échantillons SD
1/30	10 µl OIE + 290 µl SD
1/100	10 µl OIE pré-dilué 1/10 + 90 µl SD
1/150	20 µl OIE pré-dilué 1/30 + 80 µl SD
1/300	10 µl OIE pré-dilué 1/30 + 90 µl SD
1/1000	10 µl OIE pré-dilué 1/100 + 90 µl SD
1/3000	10 µl OIE pré-dilué 1/300 + 90 µl SD

Cette gamme de dilution de sérum standard OIE doit être présente dans chaque série et chaque plaque.

B. REALISATION DU TEST

I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TMOINS

1. Distribution des témoins :

Les témoins ne sont pas prêts à l'emploi, ils doivent être dilués au 1/10.
Déposer 90 µl de diluant des échantillons, et ajouter 10 µl de témoin négatif dans les puits A1 et A2, et 10 µl de témoin positif dans les puits B1 et B2.

2. Distribution des dilutions et échantillons :

Déposer 90 µl de diluant des échantillons, et ajouter 10 µl de chaque pré-dilution des échantillons au 1/10 ou chaque dilution de sérum OIE de 1/10 à 1/3000 dans les puits et agiter doucement.

- Les barrettes doivent être toujours placées de la même façon pendant le lavage et la lecture des densités optiques.

- Couvrir les plaques avec un film adhésif, couper la longueur nécessaire en fonction du nombre de barrettes utilisées.

- Mélanger doucement les plaques manuellement ou à l'aide d'un agitateur de plaques.

	1	2	3	4
A	N 1/10	N 1/10	OIE 1/30000	OIE 1/30000
B	P 1/10	P 1/10	S1 1/100	S1 1/100
C	OIE 1/100	OIE 1/100	S2 1/100	S2 1/100
D	OIE 1/300	OIE 1/300	S3 1/100	S3 1/100
E	OIE 1/1000	OIE 1/1000	S4 1/100	S4 1/100
F	OIE 1/1500	OIE 1/1500	S5 1/100	S5 1/100
G	OIE 1/3000	OIE 1/3000	S6 1/100	S6 1/100
H	OIE 1/10000	OIE 1/10000	S7 1/100	S7 1/100

Titrage d'anticorps (dilutions finales)

Des valeurs de DO over peuvent être observées pour la dilution 1/100 de l'OIE. Dans ce cas, utilisez seulement les 6 dilutions suivantes pour réaliser la droite de régression.

3. Incubation de la plaque

Incuber la plaque 1 heure ± 5 min. à +37°C ± 3°C

LAVAGE :

Tampon de lavage : Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage par dilution de la solution de lavage (W) au 1/10 dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Préparer le conjugué en diluant le concentré (CJ) au 1/10 dans le diluant du conjugué (CD). 2 ml de conjugué pour une barrette, soit 0,2 ml de CJ dans 1,80 ml de CD.

2. Distribution du conjugué :

Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules. Recouvrir avec un film adhésif neuf.

3. Incubation du conjugué :

Incuber le conjugué 1 heure ± 5 min. à +37°C ± 3°C.

LAVAGE :

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

III – REVELATION

1. Ajout du substrat :

Distribuer 100 µl de substrat de la peroxydase (PS) par cupule. Ne pas couvrir avec un film adhésif. Agiter doucement la plaque manuellement ou utiliser un agitateur de plaques pour homogénéiser.

2. Incubation du substrat :

Incuber 30 minutes ± 5 min. à température du laboratoire (+20°C ± 5°C) et à l'obscurité.

3. Ajout de la solution d'arrêt :

Distribuer 50 µl de solution d'arrêt (S) par cupule.

Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

4. Mesure des densités optiques :

Mesurer les densités optiques (DO) en bichromatisme à 450 et 630 nm ou en monochromatisme à 450 nm (dans le jaune).

La lecture en bichromatisme est fortement recommandée.

Dans le cas d'utilisation d'un lecteur monochromatique, veuillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque séance (ou de chaque plaque) sont validés :

- si la densité optique (DO) obtenue avec le témoin positif est $\geq 0,300$, et

- si la densité optique (DO) obtenue avec le témoin négatif est $< 0,50 \times DO P$, et

- si le coefficient de corrélation entre le logarithme népérien (ln) des DO et le ln des concentrations en anticorps du sérum OIE est $> 0,95$.

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Méthode : CALCUL DU TITRE A PARTIR DE LA DROITE DE REGRESSION (L'utilisation d'un tableur est conseillé. Sur simple demande à Synbiotics, nous pouvons mettre à disposition un fichier Excel préformaté)

- Calculer la DO moyenne pour chaque échantillon testé ainsi que pour chaque dilution d'OIE.

- Calculer le logarithme népérien (ln) de chaque DO moyenne et le ln de la concentration en anticorps pour chaque dilution d'OIE (de 6,7 à 0,0223 UI/ml).

- Tracer la courbe : $\ln(DO) = f[\ln(\text{concentration en anticorps})]$ afin de déterminer la droite de régression du sérum standard OIE.

- En utilisant les résultats obtenus pour chaque dilution du sérum OIE établir une droite de régression entre $\ln[\text{concentration en anticorps}]$ exprimée en EU/ml (en équivalent d'unité par ml) et $\ln[DO]$ pour établir le modèle mathématique:

$$\ln[\text{concentration en Ac (EU/ml)}] = a + b \cdot \ln DO$$

- Pour chaque échantillon testé, calculer la moyenne des DO et la concentration en anticorps de chaque échantillon (EU/ml) à partir du modèle établi :

$$\text{Concentration en Ac de l'échantillon (EU/ml)} = e^{(a+b \cdot \ln DO)}$$

- Si le titre calculé est $> 0,6$, l'animal est considéré comme protégé.

- Si le titre calculé est $< 0,6$, l'animal est considéré comme non protégé (une confirmation par la méthode FAVN peut être réalisée).

Pour toute question, nous contacter :
SYNBOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
69367 LYON Cedex 07 - France
Tel : 04.72.76.11.11 - Fax : 04.72.76.11.10
www.synbiotics.fr info@synbiotics.fr

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT /
POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

EXEMPLE

* Contrôle positif :

puits B1 = 0,610; puits B2 = 0,690 → $\overline{DO} P = 0,650$

* Contrôle négatif :

puits A1 = 0,190; puits A2 = 0,210 → $\overline{DO} N = 0,200$

* Echantillon 1 : DO 1 = 1,790 DO 2 = 1,750 → $\overline{DO} = 1,770$

* Echantillon 2 : DO 1 = 0,350 DO 2 = 0,390 → $\overline{DO} = 0,370$

* validation du test : $\overline{DO} P = 0,650 > 0,300$ et $\overline{DO} N = 0,200 < 0.50 \times 0,650 = 0,325$, le test est validé.

Echantillons (dilution finale)	Ac UI/ml	DO 1	DO 2	DO moy.	ln [conc. Ac]	ln (DO moy.)
OIE 1/100	6,7	over	over	over	1.9021	-
OIE 1/300	2,233	1,280	1,237	1,259	0.8033	0.2299
OIE 1/1000	0,67	0,809	0,751	0,780	-0.4005	-0.2485
OIE 1/1500	0,447	0,600	0,620	0,610	-0.8052	-0.4943
OIE 1/3000	0,2233	0,406	0,425	0,416	-1.4992	-0.8783
OIE 1/10000	0,067	0,214	0,217	0,216	-2.7031	-1.5348
OIE 1/30000	0,0223	0,148	0,154	0,151	-3.8032	-1.8905
Ech1 1/100	inconnu	1,790	1,750	1,770	inconnu	0,5710
Ech2 1/100	inconnu	0,350	0,390	0,370	inconnu	-0,9943

Modèle mathématique :

$\ln [\text{concentration Ac}] = 0,255 + 2,063 * \ln DO$

* Validation du test : coefficient de corrélation $r = 0,996 > 0,95$, le test est validé

* Concentration en Ac de l'échantillon 1 :

$e^{(0,255 + 2,063 * \ln DO)} = e^{(0,255 + 2,063 * 0,5710)} = 4,19 \text{ UE /ml} \rightarrow$ animal protégé

* Concentration en Ac de l'échantillon 2 :

$e^{(0,255 + 2,063 * \ln DO)} = e^{(0,255 + 2,063 * -0,9943)} = 0,17 \text{ UE /ml} \rightarrow$ animal non protégé
(une confirmation par la méthode FAVN peut être réalisée).