

LACTELISA[®] BLV Ab Bi Indirect

**KIT POUR LA DETECTION DES ANTICORPS ANTI GP51
DU VIRUS DE LA LEUCOSE BOVINE (BLV)
DANS LE LAIT DE BOVIN
(INDIVIDUELS ET MELANGES)**

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

192 réactions bicupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit LACTELISA[®] BLV Ab Bi Indirect utilise une technique immuno-enzymatique indirecte bicupule permettant la détection des anticorps anti-glycoprotéine d'enveloppe (gp 51) du virus de la leucose bovine enzootique (BLV) dans le lait de bovin. La réaction comporte trois étapes:

1. Chaque échantillon de lait est distribué dans deux cupules adjacentes sensibilisée par un antigène cellulaire (colonne impaire), et un antigène viral : gp 51 (colonne paire). Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène viral.

2. Après lavage, un conjugué anticorps monoclonal (AcM) anti-IgG de bovin / peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les immunoglobulines de bovin (anticorps) préalablement captées formant un complexe : (Ag gp51) - (Ac) - (AcM anti-IgG de bovin / peroxydase)

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction enzymatique, la différence d'absorption entre les deux cupules est mesurée. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée grâce à des valeurs seuils obtenues à partir des témoins.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 plaques de 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par l'Ag cellulaire (colonne impaire) et par l'Ag viral de bovin (colonne paire).	Utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué : AcM anti-IgG de bovin/ peroxydase (CJ) (20 fois concentré)	Diluer 20 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)	Prêt à l'emploi
Témoin positif (P)	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
Films adhésifs	12 films

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

Référence : LBLV2.NF version n°11 du 24/01/07

Version n°10 → n°11 : modification de la partie IV

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS

- 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.
- Eprouvettes 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. PRÉCAUTIONS 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 :

R35 : Provoque de graves brûlures.

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

La réaction est effectuée sur lait individuel ou de mélange (jusqu'à 50 laits) non dilué, entier ou de préférence écrémé. Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Lait individuel ou de mélange non dilué, entier ou écrémé	max. 5 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 à analyser.

Les laits de mélange sont à utiliser non dilués. Il est toutefois recommandé :

* pour les échantillons de laits écrémés, d'homogénéiser avant pipetage.

* pour les échantillons de laits entiers, d'attendre la décantation et de pipeter en dessous de l'anneau lipidique.

B. REALISATION DU TEST

I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

1. Distribution des témoins :

Les témoins sont prêts à l'emploi.

Après agitation des flacons, déposer 200 µl de témoin négatif N dans les cupules A1 à A4 (A1 et A3 : antigène cellulaire ; A2 et A4 : antigène viral). Déposer ensuite 200 µl de témoin positif P dans les cupules B1 à B4 (B1 et B3 : antigène cellulaire ; B2 et B4 : antigène viral).

2. Distribution des échantillons :

Distribuer les échantillons à tester non dilués à raison de 200 µl dans chacune des deux cupules (antigène cellulaire et antigène viral).

Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne.

- Toujours disposer les barrettes sur un cadre. Celui-ci sera nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.

- Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif.

- Homogénéiser par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

3. Incubation de la plaque

Incuber la plaque selon le protocole choisi :

- protocole court : 1 heure ± 5 min. à +37°C ± 3°C , ou

- protocole long : 1 nuit (14-18 heures) à +5°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.

Dans les cas d'utilisation de laits entiers, il est recommandé de tiédir à +37°C ± 3°C la solution de lavage diluée et d'augmenter si nécessaire d'une unité le nombre de cycles de lavages après incubation avec les échantillons de lait.

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) au 1/20 dans le diluant du conjugué (CD) (4 ml sont nécessaires par barrette, soit 200 µl de CJ dilué dans 3,8 ml de CD).

2. Distribution du conjugué :

Distribuer 200 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 ou 90 min. ± 5min. à + 20°C ± 5°C.

LAVAGE :

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

III – REVELATION

1. Ajout du substrat :

Distribuer 200 µl de tampon substrat (PS) par cupule. Ne pas mettre de film adhésif lors de cette étape. Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

2. Incubation du substrat :

Incuber 30 min. à ± 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. S'assurer qu'il n'y a pas de formation de bulles dans les cupules. Essuyer soigneusement le dessous des plaques.

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, veillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série sont validés :

- si la différence de densité optique obtenue avec le témoin positif est supérieure ou égale à 0,200, et

- si la différence de densité optique obtenue avec le témoin négatif est inférieure à 0,5 x ΔDO P

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La présence d'anticorps anti gp-51 du virus de la leucose bovine est caractérisée par la différence de densité optique (ΔDO) entre la cupule Ag viral et la cupule Ag cellulaire. Cette différence de densité optique est comparée à des valeurs seuils.

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

1ère Méthode : CALCUL DE L'INDICE DE L'ECHANTILLON

Indice de l'échantillon = 0,25 x (ΔDO échantillon - ΔDO P)

ΔDO P : moyenne des différences de DO observées avec le témoin positif.

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice ≥ 0 est considéré comme positif.

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice < -(ΔDO P)/16 est considéré comme négatif.

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice compris entre 0 et -(ΔDO P)/16 est considéré comme douteux.

Tout échantillon de lait de mélange présentant un indice ≥ -(ΔDO P)/16 est considéré comme positif.

Tout échantillon de lait de mélange présentant un indice < -(ΔDO P)/16 est considéré comme négatif.

Zone d'incertitude :

Tout lait individuel donnant un résultat douteux

entre 0 et -(ΔDO P)/16 doit faire l'objet d'un nouveau contrôle.

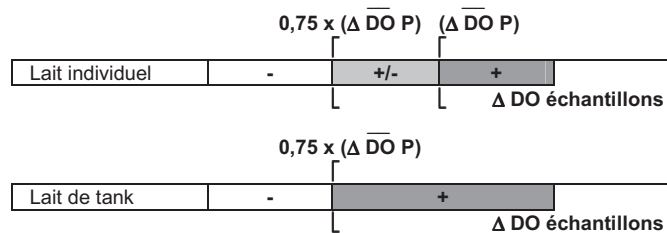
Si le résultat douteux persiste, un contrôle sera réalisé sur un nouveau prélèvement de lait.

2ème Méthode : ANALYSE DE DIFFERENCES DE DENSITES OPTIQUES

Calculer les Δ DO seuils correspondant à (Δ DO P) et 0,75 x (Δ DO P)

Comparer chacune des Δ DO des échantillons aux seuils (Δ DO P) et 0,75 x (Δ DO P)

Interprétation des résultats



Pour toute question, nous contacter :
SYNBIOTICS 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