

## SERELISA<sup>®</sup> BHV-1 Total Ab Mono Indirect

**KIT POUR LA DETECTION DES ANTICORPS CONTRE LE  
VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE BOVINE INFECTIEUSE /  
VULVOVAGINITE PUSTULEUSE  
DANS LE SERUM ET PLASMA  
(INDIVIDUEL ET MELANGE DE 10)  
ET LE LAIT DE BOVINS  
(INDIVIDUEL ET MELANGE JUSQU'A 200 LAITS)**

**TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE**

384 réactions monocupules

### I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA<sup>®</sup> BHV-1 Total Ab Mono Indirect utilise une technique immuno-enzymatique indirecte permettant la détection des anticorps dirigés contre le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) dans le sérum, plasma (individuel et mélange de 10) et le lait de bovins (individuel et mélange jusqu'à 200).  
La réaction comporte 3 étapes :

1. Chaque échantillon à tester est distribué dans une cupule sensibilisée par un antigène viral. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène viral.

2. Après lavages, un conjugué anticorps monoclonal (AcM) anti-IgG de bovin / peroxydase est ajouté.  
Il vient se fixer sur les anticorps présents, formant un complexe :  
(Ag) - (Ac) - (AcM anti-IgG de bovin / peroxydase).

3. L'excès de conjugué libre est éliminé par lavages. L'enzyme liée au complexe est révélée par adjonction d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Les densités optiques correspondantes sont alors enregistrées et interprétées en fonction de valeurs seuils calculées à partir du témoin positif.

### II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 microplaques de 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par l'Ag viral	A utiliser dans les 2 mois après ouverture du sachet. Refermer le sachet de manière hermétique après utilisation.
Solution de lavage (W) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 5 jours à température ambiante après dilution.
Diluant des sérums rose (SD)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif (P)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué bleu (CD)	Prêt à l'emploi.
Conjugué anti-IgG de bovin / peroxydase (CJ) (concentré)	A diluer 20 fois dans le diluant CD pour le protocole incubation courte et 25 fois dans le diluant CD pour le protocole incubation longue des échantillons. <b>Utiliser dans les 2 h après la dilution.</b>
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi.
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi.
Films adhésifs	12 films

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

### 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.
- Epprouvettes 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 ± 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.

- Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lots différents
- Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.
- Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 1 heure avant utilisation. **Attention** : seuls les composants qui seront utilisés dans l'étape suivante sont concernés.
- Manipuler réactifs et échantillons comme des produits à risques.
- Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau froide les parties exposées.
- Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
- 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.
- 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.
- 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 et de sécurité :

R35 : Provoque de graves brûlures.

R36 : Irritant pour les yeux.

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.

S60 : Eliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux

### V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

La réaction est effectuée sur sérum, plasma (individuel ou mélanges de 10) ou sur lait (individuel ou mélange jusqu'à 200 laits). **Les mélanges de sérums ou plasmas doivent être complétés préférentiellement avec un sérum négatif ou avec le diluant des échantillons (SD).**

Les laits doivent être écrémés avant utilisation (soit par décantation 1 nuit soit par centrifugation à faible vitesse).

Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (+23°C)
Sérum, plasma individuel ou pool de 10	max. 7 j.	Oui	Non
Lait individuel ou mélange de 200	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 de sérum ou plasma à analyser. Les échantillons doivent être dilués directement dans les cupules.

#### Préparation des échantillons

- Sérum, plasma à diluer au 1/20 dans le diluant des échantillons  
Distribuer 190 µl de diluant des échantillons (SD) puis 10 µl d'échantillon par puits.
- Pool de sérums, plasmas à diluer au 1/2 en diluant des échantillons  
Distribuer 100 µl de diluant des échantillons (SD) puis 100 µl d'échantillon par puits.
- Pas de dilution pour les échantillons de laits (individuels ou mélanges jusqu'à 200 laits).

### B. REALISATION DU TEST

#### I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TMOINS

##### 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 et A2,
- 200 µl de témoin positif (P) dans les cupules B1 et B2.

##### 2. Distribution des échantillons :

- Distribuer à raison de 200 µl par cupule, les échantillons dilués (voir préparation des échantillons, VI.A.2)
- Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif. Ce n'est pas nécessaire pour le protocole court.
- Homogénéiser par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

##### Remarques :

Les échantillons peuvent être testés en simple ou en double. Toujours disposer les barrettes sur un cadre. Celui-ci sera nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.

##### 3. Incubation de la plaque

- protocole court : 1 heure ± 5 min à +37 ± 3°C, ou
- protocole long : 1 nuit (14-18 heures) à +5 ± 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 la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) dans le diluant du conjugué (CD) ; 2 ml sont nécessaires par barrette

- dilution au **1/20** (protocole **incubation courte** des échantillons)  
100 µl de CJ dans 1900 µl de CD
- dilution au **1/25** (protocole **incubation longue** des échantillons)  
80 µl de CJ dans 1920 µl de CD

#### Utilisé le conjugué dans les 2 heures qui suivent sa préparation

### 2. Distribution du conjugué :

Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules. Recouvrir avec un film adhésif neuf. L'utilisation d'un adhésif n'est pas obligatoire.

### 3. Incubation du conjugué :

Incuber le conjugué 30 ± 2 min à +37 ± 3°C.

##### LAVAGE :

Oter délicatement le film adhésif et laver **4 fois**.

## III - REVELATION

### 1. Ajout du substrat :

Distribuer 100 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 15 ± 2 min à température du laboratoire (+23 ± 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, veuillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

## VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série seront validés :

- si la  $\overline{DO}$  du témoin positif (P) est  $\geq 0,6$ , et,
- si la  $\overline{DO}$  du témoin négatif (N) est  $< 0,4$

## VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

### SERUM, PLASMA INDIVIDUEL ET MELANGE DE 10

#### LAIT INDIVIDUEL ET MELANGE JUSQU'À 200 LAITS

- Pour chaque échantillon, calculer le ratio corrigé échantillon/témoin positif (E/P)
- Réaliser une moyenne des DO lors de dépôts multiples d'un même échantillon

Le ratio E/P se calcule de la façon suivante :

$$E / P = \frac{DO(Echantillon) - \overline{DO}(N)}{\overline{DO}(P) - \overline{DO}(N)}$$

$\overline{DO}$  = moyenne des densités optiques

### RESULTATS

Tout échantillon de **sérum ou plasma individuel**, présentant un ratio  $E/P \geq 0,65$ , en protocole incubation courte des échantillons, est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de **sérum ou plasma individuel**, présentant un ratio  $E/P < 0,65$ , en protocole incubation courte des échantillons, est considéré comme **négatif**.

Tout échantillon de **sérum ou plasma en mélange de 10**, présentant un ratio  $E/P \geq 1,00$ , en protocole incubation courte des échantillons, ou un ratio  $E/P \geq 0,80$ , en protocole incubation longue des échantillons, est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de **sérum ou plasma en mélange de 10**, présentant un ratio  $E/P < 1,00$ , en protocole incubation courte des échantillons, ou un ratio  $E/P < 0,80$ , en protocole incubation longue des échantillons, est considéré comme **négatif**.

Tout échantillon de **lait individuel ou mélange jusqu'à 200 laits**, présentant un ratio  $E/P \geq 0,25$  est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de **lait individuel ou mélange jusqu'à 200 laits**, présentant un ratio  $E/P < 0,25$  est considéré comme **négatif**.

## SERUM et PLASMA INDIVIDUEL

En protocole <b>incubation courte</b> des échantillons	-	E/P 0,65
		+
		Valeurs E/P

## SERUM et PLASMA en MELANGE DE 10

En protocole <b>incubation courte</b> des échantillons	-	E/P 1,00
		+
		Valeurs E/P

En protocole <b>incubation longue</b> des échantillons	-	E/P 0,80
		+
		Valeurs E/P

## LAIT INDIVIDUEL et MELANGE jusqu'à 200 LAITS

Lait individuel et mélange jusqu'à 200 laits	-	E/P 0,25
		+
		Valeurs E/P

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.com techsupport@synbiotics.fr

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT /  
POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

Installation Classée pour la Protection de l'Environnement (ICPE)