

## 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 LES SERUMS ET PLASMAS  
(INDIVIDUELS ET MELANGES DE 10)  
ET LES LAITS DE BOVINS  
(INDIVIDUELS ET MELANGES 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 les sérums, plasmas (individuels et mélanges de 10) et les laits de bovins (individuels et mélanges 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 4 semaines 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 après dilution.
Diluant des sérums (SD)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif fort (PH)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif faible (PL)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi.
Conjugué anti-IgG de bovin / peroxydase (CJ) (concentré)	A diluer 100 fois dans le diluant CD pour le protocole incubation courte et 200 fois dans le diluant CD pour le protocole incubation longue des échantillons. <b>Utiliser dans les 30 minutes 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°C ± 3°C et utilisés dans les délais indiqués ci-dessus.

Référence : SIBR3N.NF version n<sup>2</sup> du 24/09/09

Version n<sup>1</sup> → n<sup>2</sup> : modification de la partie VIII (phrase de résultats et seuil sérum/plasma individuel)

### 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. **Attention** : seuls les composants qui seront utilisés dans l'étape suivante sont concernés.
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.

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 (20°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. Eventuellement, prédiluer les échantillons en tube à hémolyse ou en microplaque vierge. Les échantillons peuvent également être dilués directement dans les cupules.

#### Préparation des échantillons

- Sérum, plasma à diluer au 1/20 dans le diluant des échantillons  
Pour les échantillons à pré-diluer, distribuer 190 µl de diluant des échantillons (SD) dans un tube à hémolyse ou en microplaque vierge puis 10 µl d'échantillon.  
Pour une dilution directement en puits, distribuer 95 µl de diluant des échantillons (SD) puis 5 µl d'échantillon par puits.

- Pool de sérums, plasmas à diluer au 1/5 en diluant des échantillons  
Pour les échantillons à pré-diluer, distribuer 160 µl de diluant des échantillons (SD) dans un tube à hémolyse ou en microplaque vierge puis 40 µl d'échantillon.  
Pour une dilution directement en puits, distribuer 80 µl de diluant des échantillons (SD) puis 20 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 :

- 100 µl de témoin négatif (N) dans les cupules A1 et A2,
- 100 µl de témoin positif fort (PH) dans les cupules B1 et B2.
- 100 µl de témoin positif faible (PL) dans les cupules C1 et C2.

##### 2. Distribution des échantillons :

- Distribuer à raison de 100 µl par cupule, les échantillons dilués (voir préparation des échantillons, VI.A.2)  
- Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif.  
- 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°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.

Oter délicatement le film adhésif et laver **6 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 1/100 (protocole incubation courte des échantillons)  
20 µl de CJ dans 1980 µl de CD
- dilution au 1/200 (protocole incubation longue des échantillons)  
10 µl de CJ dans 1990 µl de CD

**Attention** : le conjugué étant faiblement concentré, il ne faut pas le préparer plus de 30 minutes avant utilisation.

### 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 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 minutes ± 2 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, 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 fort (PH) est  $\geq 0,9$  et,
- si la  $\overline{DO}$  du témoin positif faible (PL) est  $\geq 0,5$  et,
- si la  $\overline{DO}$  du témoin négatif (N) est  $< 0,5$

SERUM, PLASMA INDIVIDUEL ET MELANGE DE 10

- Calculer pour chaque échantillon le ratio E/P  
Pour les sérums et les plasmas, utiliser le témoin positif fort (PH)

Le ratio E/P se calcule comme suit :

$$E/P = \frac{(\overline{DO} \text{ échantillon} - \overline{DO} N)}{(\overline{DO} PH - \overline{DO} N)}$$

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

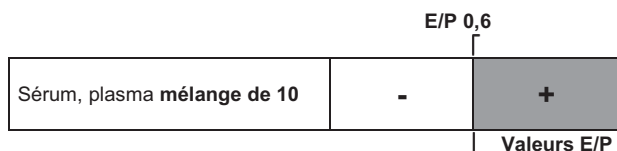
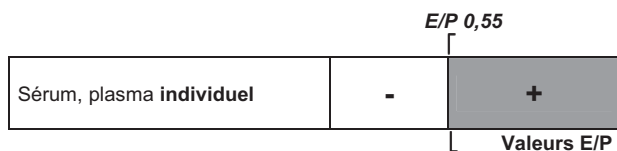
RESULTATS

Tout échantillon de sérum ou plasma **individuel**, présentant un ratio E/P  $\geq 0,55$  est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de sérum ou plasma **individuel**, présentant un ratio E/P  $< 0,55$  est considéré comme **négatif**.

Tout échantillon de sérum ou plasma **mélange de 10**, présentant un ratio E/P  $\geq 0,6$  est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de sérum ou plasma **mélange de 10**, présentant un ratio E/P  $< 0,6$  est considéré comme **négatif**.



LAIT INDIVIDUEL, MELANGE JUSQU'À 200 LAITS

- Calculer pour chaque échantillon le ratio E/P  
Pour les laits, utiliser le témoin positif faible (PL)

Le ratio E/P se calcule comme suit :

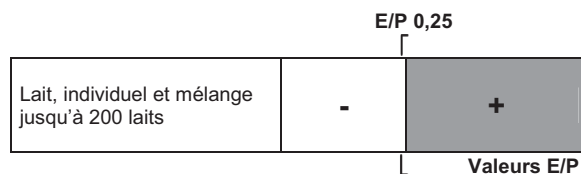
$$E/P = \frac{\overline{DO} \text{ échantillon}}{\overline{DO} PL}$$

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

RESULTATS

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**.



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