

SERELISA[®] BLV Ab Bi Indirect

KIT POUR LA DETECTION DES ANTICORPS ANTI-GP 51 DU VIRUS DE LA LEUCOSE BOVINE (BLV) DANS LE SERUM DE BOVIN (INDIVIDUELS ET MELANGES)

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

192 réactions bicupules

I. PRINCIPE DU TEST

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

1. Chaque échantillon de sérum est distribué dans deux cupules adjacentes sensibilisées 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 vient se fixer sur les immunoglobulines de bovin (anticorps) préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe :

(Ag gp 51) - (Ac anti-gp 51) - (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 à partir de valeurs seuils obtenues à partir du témoin positif.

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 (colonne paire).	A utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué AcM anti-IgG de bovin / peroxydase (CJ) (concentré 100 fois)	A diluer 100 fois dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h 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) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48h après dilution.
Diluant des échantillons (SD)	Prêt à l'emploi.
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.

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 sérum individuel ou sur mélange de sérums (jusqu'à 10) dilué au 1/10. Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérum individuel ou mélange de sérums dilué au 1/10	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 sérums et mélanges de sérums (10 sérums par mélange au maximum) à analyser. Les échantillons sont à utiliser dilués au 1/10 dans le diluant échantillons (SD). La dilution au 1/10 peut se préparer à l'avance en tubes à hémolyse ou se réaliser directement dans la cupule.

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 100 µl de témoin négatif N dans les cupules A1 à A4 (A1 et A3 : antigène cellulaire ; A2 et A4 : antigène viral). Déposer ensuite 100 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 :

- En cas d'échantillons préalablement dilués au 1/10, distribuer 100 µl par puits dans chacune des deux cupules (antigène cellulaire et antigène viral).

- En cas de dilution directe en cupule, distribuer 90 µl de diluant (SD) puis 10 µl d'échantillon et mélanger soigneusement. 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 pendant 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 la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) au 1/100 dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 20 µl de CJ dilué dans 1.98 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 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 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.

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 seront validés :

* si la différence de densité optique obtenue avec le témoin positif ($\Delta DO P$) est $\geq 0,200$, et

* si la $\Delta DO N$ est $< 0,40 \times (\Delta \overline{DO} P)$.

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 obtenues à partir du témoin positif.

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

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

- Calculer les valeurs seuils en indices :

Pour mélanges de sérums : valeur seuil : $- 0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$

Pour sérums individuels : valeur seuil négatif : $-0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$
valeur seuil positif : 0

- Calculer l'indice pour chaque échantillon testé comme suit :

Indice de l'échantillon = $0,25 \times (\Delta \overline{DO} \text{ échantillon} - \Delta \overline{DO} P)$

$\Delta \overline{DO} P$: moyenne des différences de DO observées avec le témoin positif.

Mélanges de sérums :

Tout mélange présentant un indice $\geq -0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$ est considéré comme positif.

Tout mélange présentant un indice $< -0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$ est considéré comme négatif.

Sérums individuels :

Tout sérum présentant un indice ≥ 0 est considéré comme positif.

Tout sérum présentant un indice $< -0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$ est considéré comme négatif.

Tout sérum présentant un indice compris entre $-0,0625 \times (\Delta \overline{DO} P)$ et 0 est considéré comme douteux.

Méthode 2 : ANALYSE DE DIFFERENCES DE DENSITES OPTIQUES

Calculer les ΔDO seuils correspondant à $0,75 \times (\Delta \overline{DO} P)$ [valeur seuil pour mélanges et seuil négatif pour les individuels] et ($\Delta DO P$) [valeur seuil positif pour individuels].

Comparer chacune des ΔDO des échantillons aux seuils $0,75 \times (\Delta DO P)$ et ($\Delta DO P$).

Interprétation des résultats

		$0,75 \times \Delta \overline{DO} P$	$\Delta \overline{DO} P$	DO échantillon
Individuel	-		+/-	+

		$0,75 \times \Delta \overline{DO} P$	DO échantillon
Mélange	-		+

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