

SERELISA® BLV Ab Mono Blocking

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 PAR BLOCAGE

384 réactions monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA® BLV Ab Mono Blocking utilise une technique immuno-enzymatique par blocage permettant la détection des anticorps anti-glycoprotéine d'enveloppe du BLV (gp 51) dans le sérum de bovin. Ce kit autorise, selon les normes en vigueur dans l'Union Européenne, la recherche d'un bovin infecté dans un mélange de 10 sérums. La réaction comporte trois étapes :

1. Chaque échantillon de sérum est distribué dans une cupule sensibilisée avec la gp 51 du BLV. Les anticorps anti-gp 51 éventuellement présents dans l'échantillon se fixent spécifiquement à l'antigène.

2. Après lavage, un conjugué anticorps monoclonal (AcM) anti gp51 /peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les sites gp 51 restés libres, formant un complexe : (Ag gp 51) - (AcM anti-gp 51 / peroxydase).

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavage. L'enzyme liée au complexe Ag/Ac est ensuite révélée par l'addition d'un substrat qu'elle transforme en produit coloré. Les densités optiques correspondantes sont alors enregistrées et interprétées en fonction de valeurs seuils calculées à partir des témoins.

- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, une réaction colorée intense sera mise en évidence, du fait de la fixation du conjugué sur les sites gp 51 de la phase solide.

- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il y aura moins de conjugué fixé, donc diminution ou absence de réaction colorée.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 plaques de 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par la gp 51 du virus de la leucose bovine.	A utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Solution de lavage (W) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48h après dilution.
Diluant des sérums (SD)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif (P)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi.
Conjugué AcM anti-gp 51 / peroxydase (CJ) (concentré 10 fois)	A diluer 10 fois dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h après dilution.
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	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 10 sérums au maximum. Les échantillons décantés peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérum individuel ou mélange max. 10 sérums	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 de sérum à analyser. Eventuellement, prédiluer les échantillons au 1/10 en tube à hémolyse ou en microplaque vierge.

Les échantillons peuvent également être dilués directement dans les cupules.

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 et A2 et 100 µl de témoin positif (P) dans les cupules B1 et B2.

2. Distribution des échantillons :

- En cas de sérums préalablement dilués au 1/10, distribuer à raison de 100 µl par cupule.

- En cas de dilution directe dans la cupule, distribuer 90 µl de diluant puis 10 µl du sérum individuel ou du mélange.

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 une 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 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) au 1/10 dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 200 µl de CJ dilué dans 1,8 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 +5°C ± 3°C ou 30 minutes 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 DO du témoin négatif (N) est > 0,500,

* et si le pourcentage de compétition du témoin positif est (P) > 80 %.

Ce pourcentage se calcule de la façon suivante:

$$\% P = \frac{\overline{DO} N - \overline{DO} P}{\overline{DO} N} \times 100$$

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

1ère Méthode : CALCUL DES POURCENTAGES DE COMPETITION (% sérum)

Pour chaque échantillon (E):

$$\% E = \frac{\overline{DO} N - \overline{DO} E}{\overline{DO} N - \overline{DO} P} \times 100$$

\overline{DO} = Moyenne des densités optiques, si le test est réalisé en double

Tout sérum individuel présentant un pourcentage de compétition (% E) ≥ 50 % est considéré comme positif

Tout sérum individuel présentant un pourcentage de compétition (% E) < 30 % est considéré comme négatif

Tout mélange de sérums présentant un pourcentage de compétition (% E) ≥ 30 % est considéré comme positif

Tout mélange de sérums présentant un pourcentage de compétition (% E) < 30 % est considéré comme négatif

Zone d'incertitude : Tout sérum **individuel** présentant un pourcentage de compétition situé dans une ZONE D'INCERTITUDE comprise entre 30 et 50 % doit être considéré comme douteux et faire l'objet d'un nouveau contrôle. Si le résultat douteux persiste, un contrôle sera réalisé sur un prélèvement ultérieur du même animal.

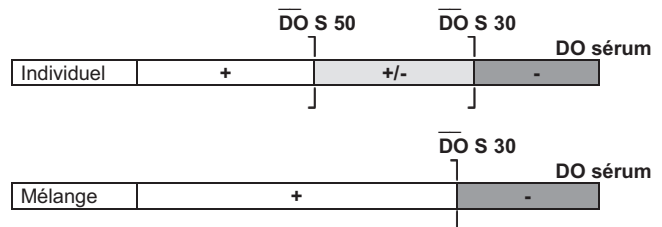
2ème Méthode : ANALYSE DE DENSITES OPTIQUES

Calculer les DO seuils correspondant à 30 % et 50 % de compétition et comparer chacune des DO des échantillons aux DO seuils DO S 30 et DO S 50.

$$DO S 30 = 0,70 \overline{DO} N + 0,30 \overline{DO} P$$

$$DO S 50 = 0,50 \overline{DO} N + 0,50 \overline{DO} P$$

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