

SYNBIOTICS EUROPE SAS
2, rue Alexander Fleming
F- 69367 Lyon, Cedex 07

SERELISA[®] BTV Ab Mono Blocking

**KIT DE DETECTION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LE
VIRUS DE LA FIEVRE CATARRHALE DANS LE SERUM ET
LE PLASMA DES RUMINANTS
(INDIVIDUELS)**

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE PAR BLOCAGE

192 réactions monocapules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA[®] BTV Ab Mono Blocking met en évidence la présence d'anticorps anti-VP7. La protéine virale 7 (VP7) est une protéine possédant les déterminants antigéniques majeurs de groupe du virus de la fièvre catarrhale (en anglais : Bluetongue Virus, BTV). Ce test permet de tester des échantillons de sérum et de plasma de ruminants, afin de certifier pour des raisons commerciales (exportation d'animaux), qu'ils ne sont pas infectés. Ce test permet également de suivre des animaux en cours de vaccination.

Dans le cas d'un animal non-vacciné, un résultat positif sur ce test indique que l'infection a eu lieu avec l'un des 25 sérotypes du virus de la fièvre catarrhale sans déterminer lequel exactement. Le test est plus sensible que l'immunodiffusion sur gel d'agar. C'est un test plus spécifique puisqu'il ne détecte pas les anticorps reconnaissant d'autres Orbivirus comme ceux des groupes EHD et Palyam. Le test a l'avantage de ne pas être mono-espèce. Des sérums de caprins, ovins, bovins et autres animaux susceptibles d'être infectés par le virus de la fièvre catarrhale peuvent être testés.

1. Chaque échantillon de sérum ou plasma, est distribué dans un puits sensibilisé avec les antigènes (Ag) du BTV. Les anticorps contenus dans l'échantillon se lient aux antigènes viraux fixés au fond du puits.

2. Après l'incubation des échantillons, le conjugué anti-VP7 (anticorps monoclonal)-peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les sites antigéniques libres car il reconnaît un épitope spécifique du BTV en formant un complexe :



3. L'excès de conjugué est éliminé par une étape de lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée par l'ajout du substrat qui est transformé en produit coloré. Les densités optiques correspondantes sont alors enregistrées et s'interprètent de la façon suivante :

- 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 antigéniques libres 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
2 plaques de 6 barrettes de 16 cupules sensibilisées avec un antigène du BTV	A utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué : AcM spécifique du BTV couplé à la peroxydase (CJ) (concentré 100 fois)	A diluer 100 fois dans le diluant CD. Utiliser dans les 2 heures après dilution.
Substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (NC)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif (PC)	Prêt à l'emploi.
Diluant des échantillons coloré en rose (SD)	Prêt à l'emploi.
Solution de lavage (W) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 5 jours après dilution.
Diluant du conjugué coloré en bleu (CD)	Prêt à l'emploi.
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi.
Films adhésifs	6

NB : Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 .
- 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.

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 ou des réactifs après leurs dates 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 ou des détergents. Veillez 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 risque et de sécurité:

R35 : Provoque de graves brûlures.

S 7 : Conserver le récipient bien fermé.

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S28 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec beaucoup d'eau.

S30 : Ne jamais verser de l'eau dans ce produit.

S36 : Porter un vêtement de protection approprié.

S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

S46 En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Les essais sont réalisés avec des échantillons individuels de sérum et de plasma dilués au 1/5^{ème}.

Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (+20°C)
Sérum ou plasma	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 ou de plasma à analyser.
Pré-diluer les échantillons au 1/5^{ème} dans le diluant des échantillons (**SD**) en tube hémolyse ou dans une plaque de dilution.
Les échantillons peuvent être également dilués directement dans les cupules.

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 (**NC**) dans les cupules A1 et A2 et 100 µl de témoin positif (**PC**) dans les cupules B1 et B2.

2. Distribution des échantillons :

- En cas d'échantillons préalablement dilués au 1/5^{ème}, distribuer à raison de 100 µl par cupule.
- En cas de dilution directe dans la cupule, distribuer 80 µl de diluant des échantillons (**SD**) puis 20 µl d'échantillon.

Les échantillons peuvent être 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.

Si utilisation d'un automate, il est possible d'incuber sans adhésif.

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

3. Incubation des échantillons et des témoins :

Incuber 45 ± 5 min à température ambiante (+23 ± 5°C).

**PAS DE LAVAGE APRES L'INCUBATION DES ECHANTILLONS
NE PAS REJETER LES ECHANTILLONS**

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Préparer la solution par dilution du conjugué (**CJ**) au 1/100^{ème} dans le diluant du conjugué (**CD**) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 20 µl de CJ dilué dans 1,980 ml de **CD**).

Utiliser le **conjugué dilué 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.

En cas d'utilisation d'un automate, il est possible d'incuber sans adhésif.

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

3. Incubation du conjugué :

Incuber pendant 30 ± 5 min à température ambiante (+23 ± 5°C).

LAVAGE :

Tampon de lavage : Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage par dilution de la solution de lavage (**W**) au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

Référence : **ASBTV1.NF version n°1 du 17/05/2010**

Un lavage homogène de la plaque est crucial pour avoir des résultats valides. L'utilisation d'un laveur automatique ou d'une pissette est conseillée.

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 ambiante (+23 ± 5°C) et à l'obscurité.

3. Ajout de la solution stop :

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 fond des cupules.

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

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série sont validés, lorsque :

- la DO moyenne du témoin négatif (NC) est > 0,6 et
- le ratio P/N doit être < 0,3 et se calcule comme suit :

$$P / N = \frac{\overline{DO(PC)}}{\overline{DO(NC)}}$$

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La présence ou l'absence d'anticorps anti-BTV dans l'échantillon (E) est déterminée par le ratio E/N.

Le ratio E/N est calculé comme suit :

$$E / N = \frac{DO(E)}{DO(NC)}$$

Réaliser une moyenne des DO lors de dépôts multiples d'un même échantillon.

Interprétation des résultats :

	E/N 0,35	E/N 0,45
Sérum ou plasma	+	+ / -
		-

Valeur E/N

Tout échantillon présentant un E/N ≤ 0,35 est considéré comme **positif**

Tout échantillon présentant un E/N > 0,45 est considéré comme **négatif**.

Zone d'incertitude : Tout sérum ou plasma présentant un ratio E/N situé dans une ZONE D'INCERTITUDE comprise entre 0,35 et 0,45 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.

Remarque

Dans le cas d'un animal non-vacciné, un résultat positif avec ce test indique que l'infection a eu lieu avec l'un des 25 sérotypes du virus de la fièvre catarrhale sans déterminer lequel exactement.

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)