

SERELISA[®] BVD p80 Ab Mono Blocking

**KIT DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-BVD/BD
CHEZ LES RUMINANTS
INDIVIDUELS (BOVINS ET CAPRINS)
INDIVIDUELS ET MELANGES (OVINS)**

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE PAR BLOCAGE

384 réactions monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA[®] BVD p80 Ab Mono Blocking est destiné à la détection des anticorps spécifiques d'une protéine commune à toutes les souches des virus BVD/MD et BD (protéine non structurale p80/125), anticorps induits lors de la multiplication virale (après infection naturelle ou vaccination avec un vaccin vivant). Le kit SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking utilise une technique immuno-enzymatique monocupule par blocage. La réaction comporte trois étapes :

1. Chaque échantillon de sérum ou plasma est distribué dans une cupule sensibilisée avec la protéine BVD/BD p80/125. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se fixent spécifiquement à l'antigène.

2. Après lavage, un conjugué anticorps monoclonal (AcM) anti-BVD/BD [p80/125] peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les sites antigéniques restés libres, formant un complexe :
(Ag) - (anti-BVD/BD [p80/125] / peroxydase).

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavage. 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 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 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 protéine BVD/BD [p80/125]	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 échantillons (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 (concentré) (CJ) AcM anti-BVD/BD p80/125 / peroxydase	A diluer dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h.
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.
- 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.

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 :

- R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.
- R35 : Provoque de graves brûlures.
- R 36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.
- R 41 : Risque de lésions oculaires graves.
- R 42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau.
- S 7 : Conserver le récipient bien fermé.
- S 24 : Eviter le contact avec la peau.
- 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 ou plasma individuels décantés, dilués au 1/10 pour les échantillons bovins, au 1/5 pour les échantillons d'ovins ou de caprins.

Pour les échantillons ovins, un test sur mélange jusqu'à 5 sérums est possible, le mélange étant testé dilué au 1/5.

Les échantillons décantés peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérum ou plasma dilués	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 plasma à analyser.

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

2. Distribution des échantillons :

- Distribuer les échantillons de bovins à tester pré-dilués au 1/10 à raison de 100 µl par cupule.
- Distribuer les échantillons d'ovins ou de caprins à tester pré-dilués au 1/5 à raison de 100 µl par cupule.
- En cas de dilution directe dans la cupule, distribuer 90 µl de diluant puis 10 µl de sérum de bovin ou 80 µl de diluant puis 20 µl de sérum d'ovins ou de caprins.
- 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 des échantillons et des témoins :

Incuber pendant 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 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 pour une barrette, à savoir 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 pendant 1 heure ± 5 min à + 20°C ± 5°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 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, 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 sérum témoin négatif (N) est $\geq 0,500$, et,
- si le pourcentage de compétition du sérum témoin positif est (P) $\geq 70\%$. Ce pourcentage se calcule de la façon suivante :

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

\overline{DO} = moyenne des densités optiques.

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

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

Pour chaque échantillon :

$\% E = \frac{\overline{DO} N - \overline{DO} E}{\overline{DO} N - \overline{DO} P} \times 100$	\overline{DO} = Moyenne des densités optiques, si le test est réalisé en double
---	---

BOVIN :

- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (% E) \geq 50 % est considéré comme **positif**.
- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (% E) $<$ 30 % est considéré comme **négatif**.

OVIN /CAPRIN INDIVIDUEL :

- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (%E) \geq 40 % est considéré comme **positif**.
- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (% E) $<$ 20 % est considéré comme **négatif**.

OVIN MELANGES JUSQU'A 5 :

Tout mélange de sérums ou plasmas présentant un pourcentage de compétition (% E) \geq 40 % est considéré comme positif et $<$ 40 % est considéré comme **négatif**.

Zone d'incertitude :

Tout sérum ou plasma individuel présentant un pourcentage de compétition situé dans une ZONE D'INCERTITUDE comprise entre 30 et 50 % pour les bovins, 20 et 40 % pour les ovins ou caprins doit être considéré comme douteux et il est conseillé de réaliser un nouveau test sur le même échantillon.

Si le résultat douteux persiste, il est recommandé de réaliser un contrôle sur un prélèvement ultérieur du même animal.

Remarques :

- Pour les échantillons donnant une DO "over" ou supérieure à 2,5, le pourcentage de compétition sera considéré comme égal à 0%.
- Il est conseillé d'interpréter avec précautions les résultats de prélèvements provenant d'animaux de moins de 6 mois, issus d'animaux ayant des anticorps anti-BVD/BD. En effet, les résidus d'anticorps d'origine colostrale peuvent entraîner des réponses douteuses, voire positives.
- Si le test est utilisé pour identifier les animaux de plus de 6 mois immunotolérants infectés de manière persistante dans les élevages infectés par les pestivirus, tout échantillon présentant un résultat douteux ou négatif parmi des animaux positifs doit être suspecté de provenir d'un animal IPI.
- Ce test détectant les anticorps anti-p80/125, il n'est pas conseillé de l'utiliser pour évaluer la protection conférée par vaccination avec les vaccins anti-BVD/BD inactivés.

2ème Méthode : ANALYSE DE DENSITES OPTIQUES

BOVINS

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.

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

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

OVINS

Calculer les DO seuils correspondants à 20 % et 40 % de compétition et comparer chacune des DO des échantillons aux DO seuils DO S 20 et DO S 40 pour les échantillons individuels ; à la DO seuil DO S 40 pour les mélanges jusqu'à 5 échantillons.

$$DO S 20 = 0,80 \overline{DO} N + 0,20 \overline{DO} P$$

$$DO S 40 = 0,60 \overline{DO} N + 0,40 \overline{DO} P$$

Interprétation des résultats :

BOVINS :

		DO S 50	DO S 30
Echantillon individuel	+	+/-	-
DO échantillons			

OVINS :

		DO S 40	DO S 20
Echantillon individuel	+	+/-	-
Mélange	+	-	
DO échantillons			

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