

SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking

KIT POUR LA DETECTION DES ANTICORPS ANTI-PCV2 (CIRCOVIRUS PORCIN DE TYPE 2) DANS LES FÉCÈS ET SERUMS DE PORCS (INDIVIDUELS)

METHODE QUANTITATIVE SUR SERUM METHODE QUALITATIVE SUR SERUM ET FÉCÈS

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE PAR BLOCAGE

384 réactions monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking utilise une technique immuno-enzymatique par blocage permettant la détection des anticorps anti-circovirus de type 2 (PCV2=Porcine Circo Virus du type 2) dans les fécès et sérums de porcs.

La réaction comporte trois étapes :

1. Les témoins et les échantillons à tester sont distribués dans une cupule sensibilisée avec des anticorps (Ac1) anti-PCV2 sur lesquels est fixé l'Ag PCV2. Les anticorps anti-Ag PCV2 éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène.

2. Après lavage, un conjugué spécifique de l'antigène PCV2 marqué à la peroxydase (Conj-HRP) est ajouté. Il se fixe sur les sites restés libres, formant un complexe :



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.

La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir des seuils.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 microplaques de 6 barrettes de 16 cupules sensibilisées par des Ac anti-PCV2 sur lesquels est fixé l'Ag PCV2	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 : Ac anti - Ag PCV2 marqué à la peroxydase (concentré) (CJ)	A diluer 100 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

Référence : SCIRCO1.NF version n°5 du 31/08/2010

Les parties en italique sont les parties modifiées depuis la dernière version. Version n°4 → n°5 : méthode qualitative avec une seule dilution, test de validation (VII), méthode de calcul et seuil pour la méthode qualitative sur sérum (VIII.(3))

NB : Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à + 5 ± 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 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 ± 3°C.
- Pots à prélèvements et écouvillons.

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 et de sécurité :

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. PREPARATION DES ECHANTILLONS

V. (1) METHODE QUANTITATIVE SUR SERUM UTILISANT TROIS DILUTIONS

La réaction est effectuée sur sérums individuels dilués, dans 3 cupules, au 1/100, 1/1000 et 1/10000 dans le diluant des échantillons (SD).

Chaque valeur est comparée à un modèle linéaire, utilisant un modèle de régression logistique et une interpolation entre les trois résultats, corrélée à un titre (voir l'interprétation pour les détails du modèle).

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Pour la titration des sérums, une gamme de 3 pré-dilutions pour chaque sérum doit être réalisée dans des tubes, suivie d'une dilution au 1/10 en plaque.

La préparation de la gamme de pré-dilution pour chaque sérum doit être la suivante :

Pré-dilution	Préparation
1/10	10 µl de sérum + 90 µl diluant des échantillons SD

1/100	10 µl de sérum pré-dilué 1/10 + 90 µl SD
1/1000	10 µl de sérum pré-dilué 1/100 + 90 µl SD

B. REALISATION DU TEST

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, A2 et A3 et 100 µl de témoin positif (P) dans les cupules B1, B2 et B3.

2. Distribution des dilutions des échantillons :

Réaliser une dilution au 1/10 en plaque : distribuer 90 µl de diluant (SD) puis 10 µl de chaque pré-dilution (1/10, 1/100 et 1/1000) pour chacun des sérums à tester.

	1	2	3	4	5	6
A	NC	NC	NC	S7 - 1:100	S7 - 1:1000	S7 - 1:10000
B	PC	PC	PC	S8 - 1:100	S8 - 1:1000	S8 - 1:10000
C	S1 - 1:100	S1 - 1:1000	S1 - 1:10000	S9 - 1:100	S9 - 1:1000	S9 - 1:10000
D	S2 - 1:100	S2 - 1:1000	S2 - 1:10000	S10 - 1:100	S10 - 1:1000	S10 - 1:10000
E	S3 - 1:100	S3 - 1:1000	S3 - 1:10000	S11 - 1:100	S11 - 1:1000	S11 - 1:10000
F	S4 - 1:100	S4 - 1:1000	S4 - 1:10000	S12 - 1:100	S12 - 1:1000	S12 - 1:10000
G	S5 - 1:100	S5 - 1:1000	S5 - 1:10000	S13 - 1:100	S13 - 1:1000	S13 - 1:10000
H	S6 - 1:100	S6 - 1:1000	S6 - 1:10000	S14 - 1:100	S14 - 1:1000	S14 - 1:10000

Aller à l'étape VI: MODE OPERATOIRE

V. (2) METHODE QUANTITATIVE SUR SERUM UTILISANT UNE SEULE DILUTION

La réaction est effectuée sur sérums individuels dilués, dans 1 cupule au 1 :1000 avec le diluant des échantillons (SD).

La densité optique issue de la lecture de la plaque sera transformée en titre selon une équation bien précise (voir l'interprétation pour les détails du modèle).

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Pour la titration des sérums, chaque sérum est dilué au 1/10 dans des tubes, suivie d'une dilution au 1/10 en plaque.

La préparation de la gamme de pré-dilution pour chaque sérum doit être la suivante :

Dilution	Preparation
1/10	10 µl de sérum + 90 µl diluant des échantillons SD
1/100	10 µl de sérum pré-dilué 1/10 + 90 µl SD

B. REALISATION DU TEST

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, A2 et A3 et 100 µl de témoin positif (P) dans les cupules B1, B2 et B3.

2. Distribution des dilutions des échantillons :

Réaliser une dilution au 1/10 en plaque : distribuer 90µl de diluant (SD) puis 10 µl de chaque pré-dilution au 1/100 pour chacun des sérums à tester.

	1	2	3	4	5	6
A	N	N	N	S19 - 1:1000	S27 - 1:1000	S35 - 1:1000
B	P	P	P	S20 - 1:1000	S28 - 1:1000	S36 - 1:1000
C	S1 - 1:1000	S7 - 1:1000	S13 - 1:1000	S21 - 1:1000	S29 - 1:1000	S37 - 1:1000
D	S2 - 1:1000	S8 - 1:1000	S14 - 1:1000	S22 - 1:1000	S30 - 1:1000	S38 - 1:1000
E	S3 - 1:1000	S9 - 1:1000	S15 - 1:1000	S23 - 1:1000	S31 - 1:1000	S39 - 1:1000
F	S4 - 1:1000	S10 - 1:1000	S16 - 1:1000	S24 - 1:1000	S32 - 1:1000	S40 - 1:1000
G	S5 - 1:1000	S11 - 1:1000	S17 - 1:1000	S25 - 1:1000	S33 - 1:1000	S41 - 1:1000
H	S6 - 1:1000	S12 - 1:1000	S18 - 1:1000	S26 - 1:1000	S34 - 1:1000	S42 - 1:1000

Aller à l'étape VI: MODE OPERATOIRE

V. (3) METHODE QUALITATIVE SUR SERUM

La réaction est effectuée sur sérums individuels dilués au 1/100 dans le diluant des échantillons (SD).

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Pour la dilution des sérums, une pré-dilution au 1/10 est réalisée en tube à hémolyse. Une dilution au 1/10 de cette pré-dilution est ensuite réalisée en plaque.

B. REALISATION DU TEST

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 à raison de 100 µl par cupule les échantillons dilués au 1/100.

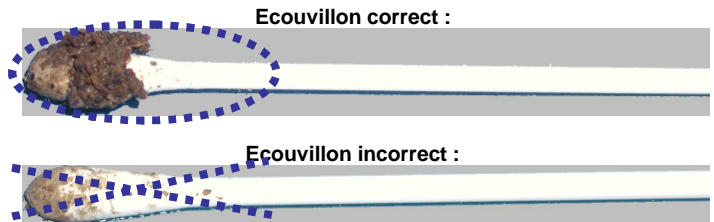
En cas de dilution directe dans la cupule, distribuer 90 µl de diluant puis 10 µl de sérum pré-dilué au 1/10.

Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne.

Aller à l'étape VI: MODE OPERATOIRE

V. (4) METHODE QUALITATIVE SUR FECES

La réaction est effectuée sur fécès (prélèvement au gant sur l'animal puis préparation en laboratoire). Un écouvillon de fécès (environ 0,15 g de fécès) est repris dans 500 µl de diluant des échantillons (SD) puis centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes. Récupérer le surnageant. Le surnageant est utilisé selon la dilution du kit.



A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.

2. Préparer les échantillons de fécès à analyser. Eventuellement, pré-diluer 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

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 d'extrait de fécès 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 d'extrait de fécès.

Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne.

Aller à l'étape VI: MODE OPERATOIRE

Les échantillons doivent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+ 5°C)	Congélation (- 20°C)	Température ambiante (20°C)
Sérum	max. 7 j.	Oui	Non
Fécès (avant préparation)	max. 7 j.	Oui	Max. 3 j.
Fécès extrait	Non	Oui	Non

VI. MODE OPERATOIRE

I - INCUBATION DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

- Les barrettes doivent être toujours placées de la même façon pendant le lavage et la lecture des densités optiques.
- Couvrir les plaques avec un film adhésif, couper la longueur nécessaire en fonction du nombre de barrettes utilisées.
- Mélanger doucement les plaques manuellement ou à l'aide d'un agitateur de plaques.

Incubation de la plaque

1 heure ± 5 min à 37 ± 3°C

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**) (1 ml par barrette, soit 10 µl de **CJ** dilué dans 990 µl 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 :

1 heure ± 5 min. à + 37 ± 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 ± 5 min. à température du laboratoire (+ 23°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 \overline{DO} du témoin négatif (N) est > 0,800, et

si la \overline{DO} du témoin positif (P) est < 0,500

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

VIII.(1) METHODE QUANTITATIVE SUR SERUM utilisant 3 DILUTIONS

La méthode de calcul et d'interprétation est basée sur le modèle suivant :

$Log(Titre) = a + b \times Logit(SNc)$, ou

$$Titre = 10^{(a+b \times Logit(SNc))}$$

Avec

$$SNc = \frac{DO(S) - \overline{DO}(P)}{\overline{DO}(N) - \overline{DO}(P)}, a = 2,5, \text{ et } b = -0,70$$

Chaque ratio corrigé, échantillon sur témoin négatif (SNc) est calculé pour chaque puits et noté $SNc_{(dilution)}$. Pour chaque échantillon, l'arbre de décision suivant est utilisé:

- si $SNc_{(1:10000)} < 0,0976$, alors le titre > 15 000 Eu (unité ELISA)
- si $0,7437 > SNc_{(1:10000)} > 0,0976$ alors

$$Titre = 10 \times 10^{a+b \times Logit(SNc_{(1:10000)})}$$

- si $SNc_{(1:10000)} > 0,7437$, alors
- si $SNc_{(1:1000)} < 0,7437$, alors

$$Titre = 10^{a+b \times Logit(SNc_{(1:1000)})}$$

- si $SNc_{(1:1000)} > 0,7437$, alors
- si $SNc_{(1:100)} < 0,95$, alors

$$Titre = 0,1 \times 10^{a+b \times Logit(SNc_{(1:100)})}$$

- si $SNc_{(1:100)} > 0,95$, alors

$$Titre = 0$$

L'utilisation d'un tableur est conseillée. Sur simple demande à Synbiotics, nous pouvons mettre à disposition un fichier Excel préformaté.

VIII.(2) METHODE QUANTITATIVE SUR SERUM utilisant 1 DILUTION

Quand la méthode avec une seule dilution est utilisée, le calcul suivant est fait :

-Si $SNc_{(1:1000)} < 0,7437$, alors

$$Titre = 10^{a+b \times Logit(SNc_{(1:1000)})}$$

-Si $SNc_{(1:1000)} < 0,051$, alors

$$Titre = +2484$$

-Si $SNc_{(1:1000)} > 0,7437$, alors

$$Titre \leq 150$$

L'utilisation d'un tableur est conseillée. Sur simple demande à Synbiotics, nous pouvons mettre à disposition un fichier Excel préformaté.

VIII.(3) METHODE QUALITATIVE SUR SERUM

La méthode de calcul et d'interprétation est la suivante :

- Calculer pour chaque échantillon le ratio S/N
- Calculer la moyenne des densités optiques de l'échantillon, si le test est réalisé en double.

Ce S/N est calculé suivant la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

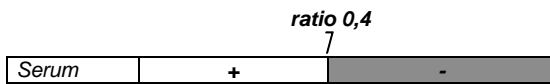
\overline{DO} échantillon = Moyenne des densités optiques de l'échantillon, si le test est réalisé en double.

\overline{DO} N = Moyenne des densités optiques du témoin négatif.

Tout échantillon présentant un ratio $\leq 0,4$ est considéré comme **positif** pour la présence d'anticorps dans le sérum.

Tout échantillon présentant un ratio $> 0,4$ est considéré comme **négatif** pour la présence d'anticorps dans le sérum.

Interprétation des résultats



VIII.(4) METHODE QUALITATIVE SUR FECES

Méthode par le calcul des ratios :

Pour chaque échantillon :

$$\text{Ratio} = \frac{DO(E)}{DO(N)}$$

\overline{DO} échantillon = Moyenne des densités optiques de l'échantillon, si le test est réalisé en double.

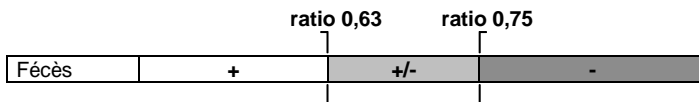
\overline{DO} N = Moyenne des densités optiques du témoin négatif.

Tout échantillon présentant un ratio $\leq 0,63$ est considéré comme **positif** pour la présence d'anticorps dans les matières fécales.

Tout échantillon présentant $0,63 < \text{ratio} < 0,75$ est considéré comme **douteux** pour la présence d'anticorps dans les matières fécales.

Tout échantillon présentant un ratio $\geq 0,75$ est considéré comme **négatif** pour la présence d'anticorps dans les matières fécales.

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.com techsupport@synbiotics.fr

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT /
POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

Installation Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE)