

## SERELISA<sup>®</sup> PCV2 Ag Capture

### KIT POUR LA DETECTION D'UN ANTIGENE DE PCV2 (CIRCOVIRUS PORCIN DE TYPE 2) DANS LES MATIERES FECALES (INDIVIDUELS)

#### TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE

192 réactions monocupules

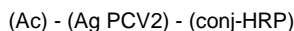
#### I. PRINCIPE DU TEST

Le kit SERELISA<sup>®</sup> PCV2 Ag Capture utilise une technique immuno-enzymatique monocupule permettant la détection d'un antigène PCV2 (Circovirus porcin du type 2). Ce test est réalisé sur fécès.

La réaction comporte trois étapes :

1. Les témoins et les échantillons à tester sont distribués dans les cupules sensibilisées avec des anticorps (Ac) anti-PCV2. La protéine virale éventuellement présente dans l'échantillon se fixe sur les sites spécifiques.

2. Après lavage, un conjugué anti-PCV2 couplé à la peroxydase (conj-HRP) permet de révéler la fixation de l'antigène en formant le complexe suivant :



3. Après lavage, l'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Les densités optiques sont alors enregistrées.  
La présence ou l'absence de l'antigène est déterminée à partir des valeurs seuils.

#### II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
2 microplaques de 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées par des Ac anti-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 ou 175 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	6 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.*
- Epruvettes 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°C ± 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.

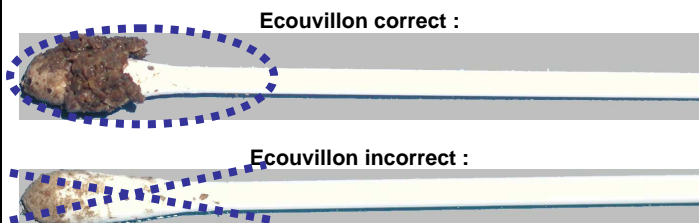
1. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lots différents
2. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.
3. Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 1 heure avant utilisation.
4. Manipuler réactifs et échantillons comme des produits 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 :

- R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.  
R 35 : 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.  
S 26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.  
S 30 : Ne jamais verser de l'eau dans le produit.  
S 45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

#### V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

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.



Les échantillons dilués peuvent être conservés comme suit :

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

Il existe 2 protocoles différents. Il convient d'en choisir un et de le suivre jusqu'au à la fin.

	Incubation échantillons	Incubation conjugué
Protocole court	Temps : 1 h Température : 37°C	Temps : 1 h Température : 37°C Dilution conj : 100x
Protocole long	Temps : 1 nuit (14h-18h) Température : 5°C	Temps : 1 h Température : 20°C Dilution conj : 175x

### A. ETAPES PREPARATOIRES

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

### 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 :

Les surnageants sont testés à raison de 100 µl par cupule.

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

Protocoles court: 1 heure ± 5 min à 37°C ± 3°C ou

Protocole long : 1 nuit (14-18 h) à 5°C ± 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 :

Diluer le conjugué CJ au 1/100 ou 1/175 avec son diluant CD. Prévoir 1 ml de conjugué dilué par barrette:

Dilution 100X:

10 µl de conjugué concentré (CJ) plus 990 µl de diluant (CD)

Dilution 175X:

5,7 µl de conjugué concentré (CJ) plus 994,3 µl de diluant (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 selon le protocole choisi :

Protocole court: 1 heure ± 5 min. à + 37°C ± 3°C ( dilution du conjugué au 1/100)

Protocole long : 1 heure ± 5 min. à + 20°C ± 5°C (d ilution du conjugué au 1/175).

#### 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, 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 témoin négatif (N) est < 0,300, et
- si la  $\overline{DO}$  du témoin positif est (P) > 0,500.

## VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour caractériser dans un échantillon la présence ou l'absence de l'antigène PCV-2, une méthode est utilisable :

#### Méthode par le calcul des ratios :

Pour chaque échantillon :

$$\text{Ratio échantillon} = \frac{\overline{DO} \text{ échantillon}}{\overline{DO} N}$$

$\overline{DO}$  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  $\geq 2,17$  est considéré comme **positif** pour la présence d'antigène PCV-2 dans les matières fécales.

Tout échantillon présentant  $1,78 < \text{ratio} < 2,17$  est considéré comme **douteux** pour la présence d'antigène PCV-2 dans les matières fécales.

Tout échantillon présentant un ratio  $\leq 1,78$  est considéré comme **négatif** pour la présence d'antigène PCV-2 dans les matières fécales.

#### Interprétation des résultats

	ratio 1,78	ratio 2,17	
Fécès	-	+/-	+

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