

ReproCHEK[®] RELAXIN

KIT DE DETECTION DE L'HORMONE RELAXINE CHEZ LA CHIENNE

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE DE TYPE SANDWICH

16 – 40 tests monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le coffret ReproCHEK[®] RELAXIN fait appel à une technique immuno-enzymatique de type sandwich pour le diagnostic de gestation chez la chienne, et permet la distinction entre gestation vraie et pseudogestation. Il mesure le taux de relaxine dans les échantillons de plasma ou sang total, dont la présence signe la gestation.

ReproCHEK[®] RELAXIN identifie cette hormone dans le sang dès la nidation, qui survient vers 19 à 21 jours après la saillie. La relaxine est détectable dès la quatrième semaine de gestation; sa concentration atteint un niveau plateau vers les semaines 6 à 8, et décroît rapidement avant la mise-bas.

Le test ReproCHEK[®] RELAXIN constitue donc un moyen peu coûteux de contrôler de manière précoce le succès ou l'échec d'une saillie planifiée, ou accidentelle et non souhaitée. De plus, une chute brutale de la concentration sérique de relaxine témoigne d'un avortement ou d'une résorption embryonnaire.

La réaction comporte deux étapes :

1. Les témoins et les échantillons à tester sont distribués dans les cupules sensibilisées avec un antisérum polyclonal de lapin anti-relaxine. Dans le même temps, un anticorps monoclonal anti-relaxine couplé à la Peroxydase est également ajouté dans chaque cupule. L'hormone éventuellement présente dans l'échantillon se fixe sur les sites spécifiques et capte le conjugué sur la phase solide, formant le complexe suivant :
(Ig lapin anti-relaxine) - (relaxine) - (Ac Mn anti-relaxine/ Peroxydase)

2. Après lavages, l'enzyme liée au complexe est révélée par adjonction d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Le développement de la coloration peut être soit contrôlé de visu, soit par enregistrement des densités optiques.

Les témoins positif et négatif fournis dans le coffret permettent d'interpréter et de valider le résultat du test.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
Demi-plaque de 4 barrettes de 12 cupules sécables sensibilisées par un anti-sérum de lapin anti-relaxine	Conserver les cupules et barrettes restantes fermées dans le sachet après chaque utilisation
Solution de lavage (SL)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif, bouchon rouge (A)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif, bouchon gris (B)	Prêt à l'emploi.
Conjugué : Anticorps monoclonal anti-relaxine marqué à la peroxydase, bouchon bleu (C)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué, bouchon blanc (E)	Prêt à l'emploi.
Tampon substrat de la peroxydase, bouchon vert (D)	Prêt à l'emploi.
Embouts pour pipette de précision	2 sachets de 25 pièces.

NB : Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à + 5°C ± 3°C et utilisés dans les conditions indiquées ci-dessus.

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Pissette pour le lavage manuel.
- Pipette de précision de 50µl ± 2µl
(Référence produit Synbiotics : K 000026)

Autre matériel accessoirement requis :

- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres permettant une lecture bichromatique à 630 nm et 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 utiliser de réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lot différents.
3. Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 30 minutes avant utilisation.
4. Le cas échéant, vérifier le bon fonctionnement des équipements utilisés (pissette, lecteur).
5. Eviter les contaminations inter-échantillons lors de leur manipulation. Il est nécessaire de changer d'embout de pipette pour chaque échantillon.
6. Pour assurer une bonne reproductibilité et une bonne fiabilité des dosages, prêter une attention particulière à la précision et à l'homogénéité des volumes prélevés. Il est fortement conseillé de ne pas tester plus de 10 échantillons par série de détermination.
7. **L'utilisation d'une pissette lors des étapes de lavages est obligatoire.**
8. Prêter une attention particulière aux opérations suivantes :
 - **Pipetage des échantillons :**
Utiliser une pipette de précision. Placer fermement un embout à l'extrémité de la pipette. Tenir enfoncer le bouton supérieur et plonger le cône dans l'échantillon à prélever. Aspirer le volume d'échantillon en relâchant lentement le bouton. Presser complètement le bouton pour la distribution de l'échantillon dans le puits approprié. Changer l'embout de pipette pour chaque échantillon.
 - **Lavages :**
Diriger un jet violent de tampon de lavage, à l'aide d'une pissette, directement dans chaque cupule. Le débordement du tampon de lavage n'interfère pas sur les résultats. S'assurer que toutes les cupules sont complètement remplies de solution de lavage (400 µl), puis complètement vidées. Les lavages s'effectuent de façon continue sans temps d'attente entre les différents cycles. Respecter le nombre minimum de cycles indiqué.
Attention : l'hémoglobine du sang provoque la dégradation du substrat. Il est essentiel de contrôler l'état de propreté des cupules avant d'ajouter le tampon substrat, et si nécessaire de réaliser deux ou trois lavages supplémentaires jusqu'à disparition de toute trace résiduelle de sang sur les parois ou le bord des cupules.
 - **Addition du substrat :**
Eviter tout contact accidentel du substrat avec le conjugué et toute solution contenant des ions métalliques, des oxydants, des détergents.

▪ **Lecture :**

Elle peut être réalisée à l'oeil ou à l'aide d'un lecteur de plaques de microtitration par mesure des densités optiques en bichromatisme.

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 :

- R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.
- 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.
- S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

La réaction est effectuée sur sang total sur anticoagulant ou plasma, à l'exclusion des prélèvements réalisée sur EDTA.

Les échantillons peuvent être conservés (ou doivent être expédiés au Laboratoire) comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Sang ou Plasma	max. 48 h.	Oui (plasma)	Non

VI. MODE OPERATOIRE

Suivre strictement le mode opératoire indiqué.

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Si les échantillons biologiques ont été conservés au froid avant le test, il est nécessaire de les amener à température ambiante.
2. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons selon le plan de plaque proposé ci-dessous. Pour une meilleure fiabilité des résultats, il est fortement recommandé de ne pas tester plus de 10 échantillons par série de détermination (du fait du temps requis pour la distribution des échantillons).
3. Disposer le nombre de cupules nécessaires sur le cadre de la plaque de microtitration.
4. Refermer les cupules et barrettes restantes non utilisées dans le sachet.

B. REALISATION DU TEST

1. Distribuer une goutte de diluant du conjugué (réactif E) dans chaque cupule.
2. Distribuer une goutte de conjugué (réactif C) dans chaque cupule.
3. DISTRIBUTION DES TMOINS
 - Distribuer les témoins négatif et positif pour chaque série de déterminations.
 - Après agitation des flacons, déposer deux gouttes de témoin négatif TN (réactif B) dans la cupule A1 et deux gouttes de témoin positif TP (réactif A) dans la cupule A2.
4. DISTRIBUTION DES ECHANTILLONS
 - Déposer à l'aide de la pipette de précision 50 µl de chaque échantillon à tester dans une cupule, selon le plan de distribution suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TN	TP	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10

Référence : CREL7.NF version n° du 24/01/07
Version n° → n° : mise en forme de la notice

5. Homogénéiser par agitation douce manuelle.
6. Incuber les témoins et les échantillons pendant 10 minutes ± 1 mn à température ambiante (+20°C ±5°C).
7. Vider le contenu des cupules dans un évier ou tout récipient approprié. Sécher les gouttes résiduelles de liquide dans les cupules sur un papier absorbant.
8. Réaliser 4 lavages des cupules à l'aide du tampon de lavage SL, suivant les recommandations du paragraphe IV- PRECAUTIONS.
9. Contrôler l'état de propreté des cupules (pas de trace résiduelle de sang) et si nécessaire, laver à nouveau.
10. Distribuer trois gouttes de tampon substrat (réactif D) par cupule.
11. Homogénéiser par agitation douce manuelle.
12. Incuber 5 minutes ± 1 mn à température ambiante (+20°C ± 5°C).
13. Lire immédiatement le résultat :
 - * soit de visu.
 - * soit par mesure des densités optiques (DO) en bichromatisme à 630 et 450 nm.

VII. VALIDATION DU TEST

1ère Méthode : LECTURE VISUELLE

Les résultats de chaque série sont validés si la coloration obtenue avec le témoin positif est bleu ciel.

2ème Méthode : MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE

Les résultats de chaque série sont validés si la DO obtenue avec le témoin positif est supérieur ou égale à 0,050.

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables selon la technique de lecture employée :

1ère Méthode : LECTURE VISUELLE

(+20°C +/-5°C) avant de les utiliser.

* Tout échantillon présentant une coloration inférieure ou identique à celle du témoin négatif est considéré comme négatif.

* Tout échantillon présentant une coloration plus forte que celle du témoin négatif est considéré comme positif.

2ème Méthode : MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE

* Tout échantillon présentant une densité optique inférieure ou égale à 0,020 (ou à la densité optique du témoin négatif si celle-ci est supérieure à 0,020) est considéré comme négatif.

* Tout échantillon présentant une densité optique supérieure à 0,020 (ou à la densité optique du témoin négatif si celle-ci est supérieure à 0,020) est considéré comme positif.

Echantillons négatifs : Tout résultat négatif sera considéré comme provenant d'une chienne non gestante. Cependant, deux résultats négatifs à 1 semaine d'intervalle peuvent être nécessaires pour confirmer de façon certaine le statut, notamment en cas d'incertitude sur la date de saillie.

Echantillons positifs : Une coloration ou une densité optique faible peut être observée en tout début de gestation. Il est alors conseillé de renouveler le test une semaine plus tard pour confirmer de façon certaine le statut d'animal gestant.

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