

PrioCHECK™ Bovine PI3 Ab Serum Kit

Test immunoenzymatique de détection spécifique des anticorps anti-PI3 dans le sérum de bovin

Référence Catalogue SPIV2

Partie N° 100020218 Pub. N° MAN0008365 Rév. A.0

Technique	Espèce	Matrice	Test	Protocole
ELISA indirect bicupule - Plaques sécables	Bovin	Sérum	Individuel	Incubation courte

⚠ AVERTISSEMENT ! Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse thermofisher.com/support.

⚠ AVERTISSEMENT ! RISQUES BIOLOGIQUES POTENTIELS. Lire les informations de sécurité relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur thermofisher.com. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés.

Informations générales

Le virus Parainfluenza de type 3 (virus PI3) est un *paramyxovirus* présent dans de nombreux cas d'affections respiratoires ou digestives chez les bovins.

Généralement le virus PI3 est considéré comme un agent co-responsable de ces affections qui font également intervenir des bactéries (*Pasteurella hemolytica*), et/ou des virus (BVD, IBR...). La transmission du virus se fait essentiellement par l'intermédiaire des sécrétions nasales. Elle serait facilitée lors du transport des animaux (contact direct, absence de ventilation, atmosphère confinée). Les symptômes classiquement observés sont : hyperthermie, toux, jetage oculo-nasal, anorexie, dyspnée, diarrhée. Le virus PI3 a également une activité immuno-suppressive, prédisposant les animaux à des infections secondaires.

Il est fortement conseillé de diagnostiquer le virus PI3 par **mise en évidence d'une séroconversion**.

Principe du test

Le test est basé sur le principe d'un **ELISA indirect bicupule**.

1. Les échantillons et les contrôles sont déposés dans la plaque sensibilisée avec de l'antigène viral PI3 (AgV, colonnes impaires) et de l'antigène de contrôle (AgC, colonnes paires). Les anticorps, parmi lesquels les anticorps spécifiques anti-PI3 éventuellement présents, se lient à l'AgV et seuls les anticorps non-spécifiques se lient à l'AgC.
2. Après lavage, un conjugué anti-bovin marqué à la peroxydase est ajouté et se fixe sur les anticorps préalablement fixés sur les microcupules.
3. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage avant addition d'un substrat chromogène. L'apparition d'une coloration bleue est la conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué.
4. Après arrêt de la réaction, la coloration devient jaune. La lecture des résultats est réalisée par un lecteur de plaques ELISA.

L'apparition d'une coloration jaune indique la présence d'anticorps. Une réaction aspécifique se traduit par une coloration équivalente entre les cupules AgV et AgC. Une réaction spécifique se traduit par une coloration plus importante dans la cupule AgV par rapport à la cupule AgC. La différence entre ces deux colorations indique le niveau de positivité de l'échantillon.

Réactifs du kit et conservation

Composant	Description	Quantité (96 tests)	Conservation
1 - Coated microplaque PI3	Plaque sensibilisée PI3, 6 barrettes doubles de 16 cupules	2 unités	5±3°C ⁽¹⁾
2 - Negative C. PI3	Contrôle négatif PI3 (NC)	500 µL	5±3°C
3 - Positive C. PI3	Contrôle positif PI3 (PC)	500 µL	
4 - Conjugate (100x) PI3	Conjugué PI3, anti-bovin HRP 100 fois concentré	350 µL	5±3°C ⁽²⁾
A - Wash (10x)	Solution de lavage, 10 fois concentrée	125 mL	5±3°C
B - Dilution Buffer PI3	Diluant PI3. Tampon de dilution pour les échantillons et le conjugué. Le diluant peut présenter un léger trouble, qui ne modifie pas les performances du kit.	50 mL	
C - Substrate	Solution substrat	24 mL	
D - Stop	Solution d'arrêt	24 mL	
Adhésifs de plaques		4	TA ⁽³⁾

⁽¹⁾ Les barrettes non utilisées peuvent être stockées dans le sachet fermé avec dessicant (fournis dans le kit) à 5±3°C jusqu'à la date de péremption du kit.

⁽²⁾ La solution de conjugué diluée est à utiliser immédiatement après préparation.

⁽³⁾ Température ambiante

Matériel et réactifs requis pour l'analyse non fournis dans le kit

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur thermofisher.com.

Micropipettes monocanales et multicanaux	Embouts de pipette à usage unique
Eau distillée ou déionisée	Incubateur de microplaque (37±2°C)
Réservoirs à usage unique	Lecteur ELISA équipé d'un filtre à 450 nm ou de filtres à 450 et 620 nm

Précautions d'emploi

- Ne pas mélanger des réactifs provenant de différents lots de kits.
- Eviter la contamination des réactifs en utilisant du matériel de prélèvement à usage unique.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.

Préparation des échantillons

Des sérums frais, réfrigérés (8 jours à 5±3°C) ou congelés (1 an < -16°C) sont utilisables. Les échantillons et les contrôles préalablement homogénéisés sont testés dilués au **1:10**.

NOTE : Il est fortement conseillé d'utiliser un traceur interne pour chaque manipulation. Une référence interne (Réf. RPI3) est disponible.

Préparation des réactifs

- Les réactifs **1 - Coated microplaque PI3**, **B - Dilution Buffer PI3**, **C - Substrate**, et **D - Stop** sont prêts à l'emploi.
- Les réactifs **2 - Negative C. PI3** et **3 - Positive C. PI3** sont à tester comme les échantillons.
- La solution de lavage **A - Wash (10x)** est à diluer au **1:10 dans de l'eau distillée/déionisée**.

Exemple : pour une barrette : 2 mL de solution **A - Wash (10x)** dans 18 mL d'eau ; pour une plaque : 25 mL de solution **A - Wash (10x)** dans 225 mL d'eau.

Mélanger après dilution. La solution **Wash diluée** peut être conservée 1 mois à 5±3°C.

NOTE : Du fait d'une forte concentration en sels, des cristaux peuvent se former dans la solution **A - Wash (10x)**. Les cristaux peuvent être dissous sous agitation. Il est recommandé d'homogénéiser la solution avant dilution.

- Le conjugué anti-bovin HRP **4 - Conjugate (100x) PI3** est à diluer au **1:100 dans la solution B - Dilution Buffer PI3**.

Mélanger après dilution. La solution **Conjugate PI3 diluée** est à utiliser **immédiatement** après préparation.

Réalisation du test ELISA

NOTE : Porter les réactifs à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$) avant la réalisation du test. La zone de tolérance des temps d'incubation est de $\pm 10\%$. Il est recommandé d'utiliser des réservoirs à usage unique pour la distribution des composants.

1. Distribution des contrôles et des échantillons

- Distribuer **10 μL** du réactif **2 - Negative C. PI3** dans les cupules A1, A2 et B1, B2 (par exemple).
- Distribuer **10 μL** du réactif **3 - Positif C. PI3** dans les cupules C1, C2 et D1, D2 (par exemple).
- Distribuer **10 μL** de **sérum à analyser** par puits dans un couple de deux cupules (chaque échantillon est déposé dans un puits AgV et dans le puits AgC adjacent).
- Distribuer **90 μL** de réactif **B - Dilution Buffer PI3** dans les cupules contenant les échantillons et les contrôles.

Agiter doucement et couvrir la plaque à l'aide d'un adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.**

2. Lavages

Vider la plaque et **réaliser 4 lavages** avec la solution **Wash diluée** (voir « Préparation des réactif ») à raison de **300 μL** par cupule. Vider et tapoter la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Les lavages sont réalisables, au choix, **manuellement** ou au **laveur automatique**. Ne pas laisser sécher les plaques.

3. Conjugué

Distribuer **100 μL** de solution **Conjugate PI3 diluée** (voir « Préparation des réactifs ») dans chaque cupule. Agiter doucement et couvrir la plaque à l'aide d'un nouvel adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.**

4. Lavages

Réitérer l'étape LAVAGES définie précédemment.

5. Révélation

Distribuer **100 μL** de solution **C - Substrate** dans chaque cupule. Agiter doucement la plaque (2 secondes). **Incuber 10 minutes à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$) et à l'obscurité.** Ne pas couvrir la plaque.

Distribuer **100 μL** de solution **D - Stop** dans chaque cupule et dans le même ordre que la solution **C - Substrate**. Agiter doucement la plaque (2 secondes).

6. Lecture

Essayer le dessous des plaques, avec un chiffon doux pour éliminer d'éventuelles poussières. Lire la plaque au maximum 30 minutes après l'arrêt de la réaction, à **450 nm** en monochromatisme ou à **450–620 nm** en bichromatisme.

Calcul des résultats

Pour chaque contrôle et chaque échantillon testé, calculer la DO corrigée (DO_c) en soustrayant la DO de la cupule AgC (DO_{AgC}) à la DO de la cupule AgV (DO_{AgV}) :

$$\text{DO}_c = \text{DO}_{\text{AgV}} - \text{DO}_{\text{AgC}}$$

NOTE : Pour les échantillons négatifs, il est possible d'obtenir des $\text{DO}_c < 0$.

Calculer la DO_c moyenne du PC ($\text{DO}_{c\text{mPC}}$), et celle du NC ($\text{DO}_{c\text{mNC}}$).

Pour chaque échantillon, calculer le ratio **E/P** (Echantillon/Positif) :

$$\text{E/P} = \text{DO}_{c\text{Echantillon}} / \text{DO}_{c\text{mPC}}$$

Validation du test

Le test est validé si :

$$\text{DO}_{c\text{mPC}} > 0.600 \text{ et } \text{DO}_{c\text{mNC}} < 0.150$$

Interprétation des résultats

Résultats	Interprétation
$E/P \leq 0.10$	Négatifs
$0.10 < E/P < 0.20$	Douteux
$0.20 \leq E/P < 0.40$	Positif +
$0.40 \leq E/P < 0.60$	Positif ++
$0.60 \leq E/P < 0.80$	Positif +++
$E/P \geq 0.80$	Positif ++++

Les animaux donnant un résultat douteux peuvent être recontrôlés.

Diagnostic de séroconversion

Dépôt des échantillons

Pour la mise en évidence d'une séroconversion (variation significative du titre en anticorps anti-PR13 entre une prise de sang précoce et une prise de sang tardive) :

- Utiliser des couples d'échantillons (sérum précoce, sérum tardif) provenant du même animal.
- Réaliser les analyses des couples d'échantillons sur la même plaque.
- Suivre le protocole opératoire du kit.

Interprétation des résultats

Pour chaque couple d'échantillons, calculer les paramètres suivants :

- DO_c du Sérum Précoce ($DO_{c\text{ PRE}}$)
- DO_c du Sérum Tardif ($DO_{c\text{ TAR}}$)
- Rapport E/P du Sérum Précoce :
 $E/P_{\text{ PRE}} = DO_{c\text{ PRE}} / DO_{c\text{ m PC}}$
- Rapport E/P du Sérum Tardif :
 $E/P_{\text{ TAR}} = DO_{c\text{ TAR}} / DO_{c\text{ m PC}}$
- Indice de Conversion (IC) du couple d'échantillon :
 $IC = DO_{c\text{ TAR}} / DO_{c\text{ PRE}}$

Une séroconversion est mise en évidence par :

$$E/P_{\text{ TAR}} \geq 0.20 \text{ et } IC \geq 2$$

Documentation et support

Service clientèle et assistance technique

Support technique : rendez-vous sur thermofisher.com/askaquestion

Visiter thermofisher.com/support pour avoir accès aux dernières nouveautés relatives aux services et à l'assistance technique, notamment :

- Numéros de téléphone partout dans le monde
- Commande et Support web
- Guides de l'utilisateur, manuels et protocoles
- Certificats d'analyse

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

9 décembre 2016

- Fiches de Données de Sécurité (FDS, également appelées FS (Fiches Signalétiques))
Remarque : Pour les FDS relatives aux réactifs et aux produits chimiques d'autres fabricants, contacter chaque fabricant.

Produit à garantie limitée

Life Technologies Corporation et ses filiales garantissent leurs produits selon les termes et conditions générales de ventes disponibles sur le site www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : thermofisher.com/support.



Prionics Lelystad B.V. | Platinastraat 33 |
8211 AR Lelystad | The Netherlands

Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

CLAUDE DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, LIFE TECHNOLOGIES ET/OU SA OU SES FILIALE(S) NE SAURAIENT ÊTRE TENUES RESPONSABLES DE DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS LIÉS AU PRÉSENT DOCUMENT OU A SON USAGE OU EN RÉSULTANT.

Historique des révisions : Pub. N° MAN0008365 (français)

Rév.	Date	Description
A.0	9 décembre 2016	Mise à jour sur le modèle du document en cours, avec mises à jour associées à la garantie, aux marques et aux logos.
1.0	10 juillet 2013	Base de référence pour l'historique de révision

Licence à Usage Limité N° 473 : Test de diagnostic vétérinaire.
L'achat de ce produit confère à l'acheteur le droit limité et incessible d'utiliser la quantité de produit achetée dans le seul but d'effectuer des services de diagnostic vétérinaire, ce qui inclut l'offre de rapports de diagnostic payants et la recherche interne au bénéfice exclusif de l'acheteur. Il ne confère aucun droit de revendre, reconditionner ou redistribuer ce produit, ou l'un quelconque de ses composants, que ce soit de manière expresse, implicite ou par préclusion. Pour plus d'informations sur l'obtention de droits supplémentaires, veuillez contacter outlicensing@lifetech.com ou le service Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

©2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire.

ThermoFisher
SCIENTIFIC