

SVANOVIR® PIV3-Ab

**Bovine Parainfluenza Virus Type 3
Test d'anticorps**

Contenu	Art. No. 10-2600-02
Microplaque / Microtitre plate Microplaque (96 puits) sensibilisée avec l'antigène non infectieux de PIV3 (scellée et gardée au sec). Colonnes impaires sensibilisées avec l'antigène viral et les colonnes paires avec l'antigène contrôle.	2 (Barrettes) 6 x 16
Conjugué / Conjugate Prêt à l'emploi (anticorps monoclonal anti-IgG de bovin conjugué à la peroxydase)	1 x 24 mL
Solution de PBS-Tween / PBS-Tween Solution Concentrée 20 x	1 x 125 mL
Solution de substrat / Substrate Solution (TMB contenant de l'H ₂ O ₂) - CONSERVER A L'OBSCURITE	1 x 20 mL
Solution stop / Stop Solution Contient de l'acide sulfurique (2M) -CORROSIF	1 x 10 mL
A. Sérum contrôle positif / Positive Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 0.1 mL
B. Sérum contrôle négatif / Negative Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 0.1 mL

Cette notice concerne le kit :
 SVANOVIR® PIV3-Ab ELISA kit: Article
 number 10-2600-02

Bovine Parainfluenza Virus Type 3

Test d'anticorps

Nom et application

SVANOVIR® PIV3-Ab est un kit immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre PIV3 dans le sérum et le lait de bovin.

Informations générales

Le Parainfluenza virus de type 3 (PIV3) est un paramyxovirus qui est très répandu chez les bovins. Généralement, PIV3 s'exprime par une infection subclinique. Le PIV3 bovin a été détecté dans des cas de « fièvre de transport » aux Etats-Unis et dans des épidémies de maladies respiratoires/entériques aigües de bovins suédois. Ces épidémies, bronchopneumonie et entérite, ont été causées par des infections mixtes – *Pasteurella hemolytica* aux Etats-Unis et le virus de la diarrhée bovine en Suède. Dans la « fièvre des transports », le surpeuplement des veaux pendant le transport et la mauvaise ventilation facilite la propagation de l'infection et aggrave la maladie. Les symptômes constatés sont la fièvre, la toux, l'anorexie, les écoulements nasale et oculaire, la dyspnée et parfois la diarrhée. L'infection expérimentale de veaux gnotobiotiques avec seulement PIV3 cause une maladie bénigne des voies respiratoires supérieures. Cependant, PIV3 agit également comme un immunosuppresseur, dans des conditions de terrains prédisposant à une infection secondaire et une réinfection. Le virus est transmis par contact direct avec les sécrétions respiratoires (aérosols). Les participants d'infections mixtes peuvent être des virus, des bactéries ou des mycoplasmes. Les troupeaux devraient être contrôlés pour la présence de PIV3 comme facteur de prédisposition à d'autres maladies.

Principe

La méthode du kit repose sur un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (ELISA). Dans cette méthode, les échantillons sont exposés à l'antigène PIV3 non infectieux dans les puits sensibilisés de la microplaque/barrette. Les anticorps anti-PIV3 (si présents dans l'échantillon) se lient à l'antigène dans les puits. Le conjugué HRP qui est ajouté ensuite forme un complexe avec ces anticorps anti-PIV3. L'excès non lié est éliminé par les rinçages avant l'ajout de la solution substrat. Une couleur bleue se développe, qui est due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'ajout de la solution stop, la couleur vire au jaune. Le résultat est lu par un spectrophotomètre pour microplaque, où la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm.

Matériels nécessaires mais non fournis

1. Micropipettes de précision
2. Embouts jetables pour micropipette
3. Eau distillée, déionisée ou de l'eau ultrapure
4. Pipetteur à canaux multiples ou laveur de microplaques
5. Récipient de 1 à 2 litres pour le PBS Tween
6. Spectrophotomètre à microplaques (filtre de 450nm)

Information sur les échantillons

Sérum:

4µl de sérum ou de plasma sont nécessaires pour chaque puits. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables.

Lait :

100µl de lait écrémé sont nécessaires pour chaque puits. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Les échantillons de lait doivent être centrifugés pendant 15 minutes à 2000 x g pour enlever la couche de lipides. Sinon, laisser les échantillons de lait jusqu'à ce que la couche de graisse se forme sur le dessus de l'échantillon. Pipeter sous la couche de graisse.

Préparation des réactifs :

Tampon PBS-Tween: Diluer au 1/20 la solution concentrée de PBS-Tween dans de l'eau purifiée. Préparer 500 ml par plaque en diluant 25 ml dans 475 ml d'eau et bien mélanger.

N.B. Avant la dilution, s'assurer qu'il ne reste pas de cristaux dans le tampon. Pour dissoudre les restes de cristaux, réchauffer et bien mélanger.

Précautions

1. Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement.
2. Conserver le kit et tous les réactifs entre 2 - 8°C.
3. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante entre 18-25°C avant usage.
4. Manipuler tout le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
5. Ne pas mélanger les composants ni les manuels de différents lots de kits.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composants du kit.
7. Respecter la date de péremption du kit.
8. Ne pas manger, boire, ni fumer là où sont manipulés les échantillons et les réactifs.
9. Changer d'embout de micropipette pour chaque échantillon.
10. Ne jamais pipeter à la bouche.
11. Inclure des contrôles de sérum négatif et positif sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, déionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Lors de la préparation des tampons, mesurer le volume requis.
14. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique qui est corrosif.
15. L'élimination des matériaux biologiques doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations !

Le volume des réactifs est suffisant pour au moins 8 tests séparés.

Les barrettes dont l'emballage est ouvert peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines au maximum.

Procédure

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante 18-25°C avant utilisation. Annoter chaque barrette avec un numéro.
2. Ajouter les échantillons

Les sérums de contrôle positif et négatif fournis sont utilisés à la fois pour l'analyse de sérum et de lait.

Echantillons de sérums

- A. Ajouter 100µl de tampon PBS-Tween dilué dans chaque puits qui sera utilisé pour les échantillons de sérum et les contrôles.
- B. Ajouter 4µl de contrôle positif (Réactif A) et 4µl de contrôle négatif (Réactif B) respectivement dans les puits sensibilisés avec l'antigène PIV3 et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Pour une confirmation, il est recommandé de tester les contrôles en doublons.
- C. Ajouter 4µl d'échantillon de sérum dans les puits sensibilisés avec l'antigène PIV3 et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.

Continuer à l'étape 3.

Echantillons de lait

- A. Pour l'addition de contrôle, voir "Echantillons de sérums" (point A et B).
- B. Ajouter 100µl d'échantillon de lait écrémé dans les puits sensibilisés avec l'antigène PIV3 et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.

Continuer à l'étape 3.

3. Mélanger la plaque. Couvrir la plaque/les barrettes et incuber à 37°C pendant 1 heure.
4. Laver la plaque/les barrettes 3 fois avec 300µL de tampon PBS-Tween dilué : à chaque cycle de lavage, remplir les puits, vider la plaque, et tapoter sur du papier absorbant pour éliminer les restes de liquide.
5. Ajouter 100µl de conjugué HRP dans chaque puits. Couvrir la plaque/les barrettes et incuber à 37°C pendant 1 heure.
6. Répéter l'étape 4.

7. Ajouter 100µL de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante 18-25°C. Commencer le décompte quand le premier puits est rempli.
8. Arrêter la réaction en ajoutant 50µl de la solution stop dans chaque puits et mélanger. Ajouter la solution stop dans le même ordre que la solution de substrat (étape 7)
9. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution stop afin d'éviter les fluctuations des valeurs de DO.

Calculs

Calculer les résultats en deux étapes comme décrit ci-dessous.

1. Valeurs de DO corrigées (DO_{Corr})

Les valeurs de densité optique dans les puits sensibilisés avec l'antigène de PIV3 sont corrigées en soustrayant les valeurs de DO des puits contenant l'antigène contrôle.

$$DO_{PIV3} - DO_{Contrôle} = DO_{Corr}$$

Calculer les valeurs moyennes de DO_{Corr} pour chaque échantillon et contrôle.

2. Valeurs de pourcentage de positivité (PP)

Toutes les valeurs corrigées de DO pour les tests d'échantillons comme pour le contrôle négatif sont reliées à la valeur de DO corrigée du contrôle positif selon la formule suivante :

$$PP = \frac{DO_{Corr} \text{ (Echantillon ou Contrôle négatif)}}{DO_{Corr} \text{ (Contrôle positif)}} \times 100$$

Interprétation des résultats

Critère de validité du test

Pour garantir la validité de l'essai, les valeurs de DO des duplicats du contrôle positif ne doivent pas différer de plus de 25% de la valeur moyenne de ces duplicats. En outre, les valeurs des contrôles doivent être comprises dans les limites suivantes :

OD_{Corr} Contrôle positif > 0.5

PP Contrôle négatif < 10

Si l'un de ces critères n'est pas satisfaisant, le test est invalide. Pour les tests invalides, la technique peut-être suspectée et l'essai doit être répété.

Interprétations des échantillons de sérums et de laits :

PP Interprétation

< 10 Négatif

≥ 10 Positif

References

1. Buxton, A., Fraser, G. (1977). Animal Microbiology, vol. 2. Rickettsias and Viruses. Blakwell, Oxford, pp 532 and 660.
2. Mohanty, S.B. (1978) Bovine respiratory viruses. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 22,83-109.
3. Woods,G.T. (1968) The natural history of bovine myxovirus parainfluenza-3. J.A.V.M.A. 152, 771-777.

Symbols

	Article No.
	Serial (batch) No.
	Temperature limit
	Expiry date
	Corrosive
	Number of tests
	See manual
	Manufacturer
	Telephone
	Fax



Produit par SVANOVA
Distribué par BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
France



+33 (0) 4 26 78 47 60

Support technique

+33 (0) 4 26 78 47 60

contact@biosellal.com