



MONOSCREEN[®] Ab ELISA

***Clostridium perfringens* toxine Bêta**

Test ELISA sérologique pour le dosage des anticorps spécifiques de la toxine
Bêta de *Clostridium perfringens*

Test de blocage pour sérums sanguins et plasmas

Test diagnostique pour toutes espèces

Monocupule

I - INTRODUCTION

L'entérotoxémie est une affection intestinale qui peut toucher toutes les espèces animales domestiques. Elle est causée par une bactérie, *Clostridium perfringens* qui produit certaines toxines. Cette bactérie à coloration de Gram positive est anaérobie et elle peut former des endospores très résistantes à la température. La bactérie est subdivisée en 5 types (types A, B, C, D et E) sur base de sa capacité à produire ou non les 4 toxines létales majeures (Alpha, Bêta, Epsilon ou Iota). *Clostridium perfringens* peut causer chez l'homme des gangrènes gazeuses (myonécrose clostridienne), des intoxications d'origine alimentaire ou des entérocolites nécrosantes chez l'enfant. La bactérie est aussi l'agent causal du pigbell, une pathologie digestive qui touche les populations de Papouasie. *Clostridium perfringens* est l'agent responsable de la dysenterie de l'agneau, de l'entérotoxémie ovine (struck) et de la maladie du rein pulpeux du mouton. Elle est également l'agent causal de l'entérotoxémie du veau ou de l'agneau. En règle générale, on peut retrouver de grandes quantités de bactéries et de toxines bactériennes dans le fluide intestinal des animaux décédés d'entérotoxémie. Comme *Clostridium perfringens* est un commensal de l'intestin des humains et des animaux, l'identification seule de la bactérie dans le contenu intestinal est insuffisante pour poser un diagnostic étiologique. Il est en effet nécessaire de déterminer le toxinotype de la bactérie isolée et de quantifier *Clostridium perfringens* au sein du liquide intestinal. La trousse BIO K 317 est préparée pour suivre le statut sérologique des animaux après vaccination ou lors d'un contact naturel avec la bactérie. Comme il s'agit d'un test de blocage, il peut être utilisé chez toutes les espèces animales.

II - PRINCIPE DU TEST

La microplaque à 96 puits a été sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique de la toxine bêta de *Clostridium perfringens*. L'utilisateur de la trousse dépose dans les cupules de la microplaque les sérums sanguins et les plasmas à tester préalablement dilués. Après une incubation de 2 heures et une étape de rinçage, il ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique de la toxine bêta de *Clostridium perfringens* couplé à la peroxydase. Après incubation et lavage de la préparation, il ajoute la solution de révélation (TMB monocomposant). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérogène. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle au titre sérique de l'échantillon. Des sérums de contrôle positif et négatif sont fournis avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : microplaques de 96 puits. L'entièreté de chaque microplaque est sensibilisée avec la toxine bêta de *Clostridium perfringens*.
- **Solution de lavage** : 1 flacon de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Stocker la solution diluée entre +2°C et +8°C.
- **Tampon de dilution** : 1 flacon de tampon de dilution coloré. Prêt à l'emploi.
Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums sanguins, des plasmas et du conjugué. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman. Conserver la solution entre +2°C et +8°C.
- **Conjugué** : 1 flacon de conjugué anti- toxine bêta de *Clostridium perfringens* couplé à la peroxydase de raifort. Ce réactif est à diluer au 1/20 dans la solution de dilution.
- **Sérum positif** : 1 flacon contenant le sérum positif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Sérum négatif** : 1 flacon contenant le sérum négatif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière. Il est prêt à l'emploi.
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 317/1	BIO K 317/2
Microplaque	1	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 60 ml (1 X)	1 X 60 ml (1 X)
Conjugué	1 X 0,625 ml (20X)	1 X 1,250 ml (20X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	1 X 12 ml (1 X)	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 6 ml (1 X)	1 X 15 ml (1 X)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Bêchers, tubes en plastic, portoir pour tubes, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel).

V - PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic "in vitro" et il est à usage strictement vétérinaire.
- Les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C. Les réactifs ne peuvent être garantis si leur date de péremption est dépassée et/ou s'ils n'ont pas été conservés dans les conditions décrites dans cette notice.
- La solution de lavage concentrée peut être stockée à température ambiante. Après dilution, cette solution a une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C.
- Les barrettes non utilisées doivent être stockées immédiatement dans l'enveloppe d'aluminium en veillant à conserver le dessicant bien sec et en fermant hermétiquement l'enveloppe. Si ces précautions sont scrupuleusement respectées, il est possible de préserver l'activité des barrettes jusqu'à la date de péremption de la trousse.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousse.
- Il est important de veiller à la qualité de l'eau utilisée pour préparer les diverses solutions de la trousse. Ainsi, il ne faut pas utiliser d'eau susceptible de contenir des agents oxydants (hypochlorite de soude) ou des sels de métaux lourds car ils pourraient réagir avec le chromogène.
- Ecarter les solutions contaminées par des bactéries ou des champignons.
- La solution d'arrêt contient de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Le matériel utilisé qui a été en contact avec les échantillons doit être considéré comme potentiellement infectieux et être éliminé en respectant la législation en vigueur du pays.
- Pour garantir la fiabilité des résultats, il importe de respecter parfaitement le protocole. On veillera particulièrement à respecter les temps et les températures d'incubation ainsi que la précision des volumes et des dilutions.

VI – MODE OPERATOIRE

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation. Retirer la microplaque de son emballage.
- 2- PREPARATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS.
Les sérums sanguins ou les plasmas doivent être dilués au 1/2. Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula.
Déposer 50µl de tampon de dilution directement dans la microplaque de la trousse. Ajouter dans chacun des puits 50µl de chaque échantillon, mélanger. Procéder de la même manière pour les sérums de référence (sérums positif et négatif). Couvrir et incuber 2 heures à 37°C.
- 3- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies au chapitre "composition de la trousse". Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. A l'issue de ces 3 lavages, passer au point suivant.
L'utilisation d'un laveur de plaques (automatique ou manuel) est également conseillée. Il est cependant nécessaire de régler la profondeur d'immersion des aiguilles de manière à ne pas altérer la couche de réactifs adsorbés sur le fond des puits.
- 4- Diluer au 1/20 le conjugué dans le tampon de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 600 µl de la solution mère de conjugué dans 11,400 ml de solution de dilution)
Ajouter dans chaque puits utilisé, 100 µl du conjugué. Couvrir et incuber la plaque à 37°C durant ½ heure.
- 5- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage comme décrit au point 3.
- 6- Distribuer le TMB sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution doit être parfaitement incolore. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution par de la peroxydase. Si cette éventualité se présente, la solution doit être éliminée et du nouveau TMB doit être prélevé avec du matériel parfaitement propre.
- 7- Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C et à l'abri de la lumière, sans couvrir. Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
- 8- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 9- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

VII – CALCUL DES RESULTATS

Mesurer les densités optiques des sérums positif et négatif (DO pos et DO nég) ainsi que celles de tous les échantillons (DO échantillons).

Pour chaque échantillon testé et pour le sérum positif, calculer le pourcentage d'inhibition (%inh) en appliquant les formules suivantes :

$$\% \text{ inh échantillon} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ échantillon}) / DO \text{ nég}] * 100$$

$$\% \text{ inh positif} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ pos}) / DO \text{ nég}] * 100$$

VIII – VALIDATION DU TEST

Le test ne peut être validé que si les deux conditions suivantes sont remplies :

- DO nég – DO pos > 0,7
- % inh positif > 30 %

IX – INTERPRETATION DES RESULTATS

Déterminer le niveau de positivité des échantillons en utilisant l'échelle reprise au tableau 1.

Tableau 1	Valeur calculée	Niveau de positivité
	% inh < 20	0
	20 <= % inh < 40	+
	40 <= % inh < 60	++
	60 <= % inh < 80	+++
	80 <= % inh	++++

X – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA <i>Clostridium perfringens</i> toxine bêta	1x96 tests	BIO K 317/1
	2x96 tests	BIO K 317/2

