Notice d'utilisation
BIOK289-Alpha_Ag_NO_(FR)_V04
28/03/2023

MONOSCREEN Ag ELISA

Monoscreen AgELISA *Clostridium perfringens* toxine Alpha

Référence : BIO K 289

Test ELISA de détection de la toxine Alpha de *Clostridium perfringens*
Bicupule, sandwich

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire

Echantillon	Toutes espèces
Surnageants de culture	✓
Fluides biologiques	✓

Présentation

Référence produit	BIO K 289/1
Format	1 plaque, barrette de 8 puits
Réactions	48 tests

Composition du kit

Matériel fourni	BIO K 289/1
Microplaque	1
Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Solution de dilution colorée (1X)	1 X 100 mL
Conjugué (1X)	1 X 12 mL
Contrôle positif	1 X 4 mL
Solution de TMB monocomposant (1X)	1 X 12 mL
Solution d'arrêt (1X)	1 X 6 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
28/03/2023	V04	Modification du principe du test : anticorps polyclonal remplacé par anticorps monoclonal. Modification composition du kit : contrôle positif lyophilisé remplacé par contrôle positif liquide.

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

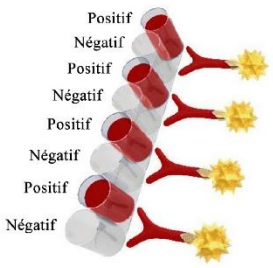
A. Introduction

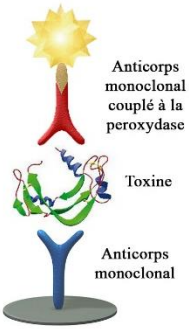
La plupart des pathologies vétérinaires causées par *Clostridium perfringens* sont de type intestinal et impliquent les types B, C et D. Le type A a été impliqué dans de rares cas de gastrites et de maladies hémolytiques des ruminants et dans des entérites hémorragiques du bétail, des chevaux et des chiens. *Clostridium perfringens* type A cause des entérites nécrotiques chez la volaille et des toxi-infections alimentaires chez l'homme. La mise en évidence de la toxine Alpha dans le contenu de l'intestin grêle est la seule façon de poser un diagnostic de certitude d'entérotoxémie. Jusqu'à présent, cette mise en évidence de la toxine Alpha passait par l'injection par voie intraveineuse chez la souris d'échantillons suspects en présence d'immunosérums capables de neutraliser les autres toxines. La méthode ELISA permet de détecter la toxine Alpha dans des fluides biologiques (contenu intestinal, liquide péritonéal ou péricardique) ou dans des surnageants de culture en moins de 3 heures. Le test peut être utilisé en association avec les tests Epsilon et Bêta pour typer des souches inconnues.

B. Principe du test

Les lignes *impaires* A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de la toxine Alpha de *Clostridium perfringens* tandis que les lignes *paires* B, D, F, H de ces microplaques ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal témoin. On dispose de la sorte d'un témoin négatif véritable qui permet de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les échantillons (contenu de l'intestin grêle, fluide péritonéal etc...) sont dilués dans la solution de dilution et incubés durant une heure sur la microplaque à 21°C ± 3°C. Les surnageants de culture sont utilisés sans dilution. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique de la toxine Alpha couplé à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C ± 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB mono-composant). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. En cas de présence de la toxine dans l'échantillon, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant l'antigène et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en toxine de l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps monoclonal témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps monoclonal spécifique de la toxine. Un antigène de contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

Toxinotypes	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++





C. Matériel supplémentaire et équipement requis non fournis

- Eau distillée/déminéralisée
- Pipette mono ou multicanaux de précision (gamme 2-20 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL) avec embouts à usage unique et réservoirs à réactifs
- Lecteur de microplaques (filtre 450 nm)
- Laveur de microplaques (facultatif)
- Microplaque de dilution (facultatif)
- Matériel de laboratoire standard : cylindre gradué, portoir, couvercle, ...

D. Précautions d'utilisation

- Conserver les réactifs entre +2 et +8°C.
- Les barrettes non utilisées sont conservées dans l'enveloppe d'aluminium fermée hermétiquement avec son dessiccant.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de validité.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousses.
- Veiller à utiliser de l'eau distillée/déminéralisée.
- La solution d'arrêt est de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Conserver la solution de TMB à l'abri de la lumière.

E. Préparation des solutions

- Les solutions sont à préparer extemporanément.
- La solution de lavage est à diluer 20 fois dans de l'eau distillée/déminéralisée. La solution cristallise spontanément à froid. Amener le flacon à 21±3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent ; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire.
- La solution de dilution est prête à l'emploi.
- Le conjugué est prêt à l'emploi.
- La solution d'arrêt est prête à l'emploi.
- La solution de TMB est prête à l'emploi. Elle doit être parfaitement incolore.

F. Préparation des échantillons

- Le contrôle positif est prêt à l'emploi.

- Les échantillons biologiques (contenu intestinal, liquide cavitaire, ...) sont dilués au demi dans la solution de dilution.

N.B : La consistance de l'échantillon doit être homogène. Si l'homogénéisation est difficile, *ajouter des billes de verre dans le récipient et déliter la selle en agitant vigoureusement l'ensemble. Ne pas centrifuger.*

- Les surnageants de culture sont utilisés non dilués.

N.B : Les meilleurs résultats sont obtenus avec des cultures réalisées en milieu TGY en condition anaérobie (culture en tube sans agitation) à 37°C. L'optimum de temps de culture pour les toxines Alpha est d'une nuit complète ou tout au moins jusqu'à la production maximale de gaz.

G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à 21±3°C avant utilisation.
- Lire attentivement les points précédents.

N.B. : Pour éviter les différences de temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer en microplaques de dilution. Déposer dans celle-ci le contrôle positif et les échantillons avant leur transfert (100 µL) dans la microplaque du kit à l'aide d'une pipette multicanaux.

1. Distribuer les échantillons biologiques dilués, le contrôle positif du kit et les surnageants de culture non-dilués à raison de 100 µL par puits. Disposition verticale, bicupule (expl : échantillon n°1 : puits A1 et B1, contrôle positif : puits C1 et D1). Couvrir et incuber la plaque à 21 ± 3°C pendant 60 ± 5 min.

2. Eliminer le contenu de la microplaque. Laver 3 fois la microplaque avec 300 µL de solution de lavage par puits. Eviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.

3. Ajouter 100 µL de conjugué prêt à l'emploi par puits. Couvrir et incuber la plaque à 21 ± 3°C pendant 60 ± 5 min.

4. Eliminer le contenu de la microplaque. Laver 3 fois la microplaque avec 300 µL de solution de lavage par puits. Eviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.

5. Distribuer 100 µL de la solution de TMB par puits. Incuber à 21 ± 3°C pendant 10 ± 1 min à l'abri de la lumière, sans couvrir.

6. Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µL par puits. La couleur passe de bleu à jaune.

7. Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm dans les 5 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt.

H. Validation des résultats

Le test ne peut être validé que si :

- la différence entre les lectures de densité optique (DO) de la ligne impaire et paire du contrôle positif est supérieure à la valeur indiquée dans le contrôle de qualité (QC) annexé dans le kit .

Contrôle + / toxine alpha : $DO_{\text{ligne impaire}} - DO_{\text{ligne paire}} > QC$

I. Interprétation des résultats

Calculer pour chaque échantillon son coefficient (E/P %) au moyen de la formule suivante :

$$E/_P\,(\%) = \frac{DO\ \text{échantillon ligne impaire} - DO\ \text{échantillon ligne paire}}{DO\ Ctl.pos.\ \text{ligne impaire} - DO\ Ctl.pos.\text{ligne paire}}$$

Avec Ctl. pos. = contrôle positif

	Résultats	Statut
Echantillon	E/P % < x*%	Négatif
	E/P % ≥ x*%	Positif

*Déterminer le statut des échantillons pour chacune des toxines et *Clostridium perfringens* à l'aide du tableau présent dans le contrôle de qualité (QC) annexé dans le kit.

Obtenez rapidement et facilement l'interprétation de vos résultats grâce à notre plateforme en ligne gratuite **AnalysiScreen™** disponible sur notre site web : https:// www.biox.com

ANALYSISCREEN

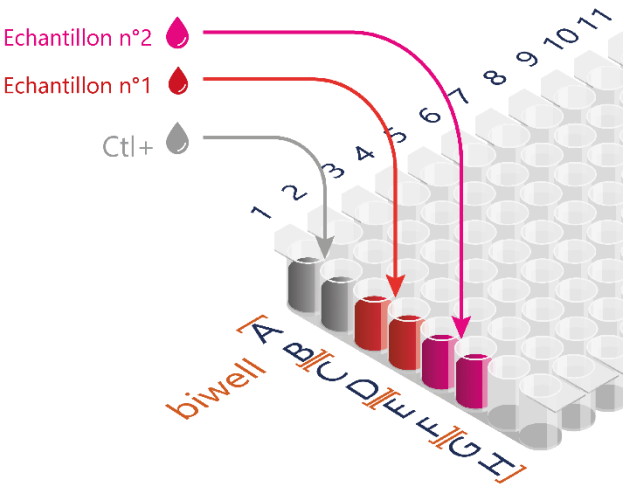
AnalysiScreen™ est le nouveau module de lecture et d'interprétation de tous les types de plaques ELISA Monoscreen™ et Multiscreen™. **AnalysiScreen™** est :

- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : https://www.biox.com
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de plaques Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi

SCAN ME

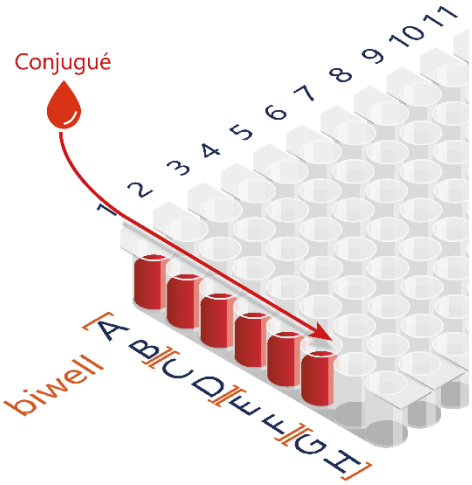
Notes*

1 Distribuer 100 µL :
- Dilution des échantillons biologique 1/2
- Surnageants de culture 1/1
- Contrôle positif (Ctl+) 1/1



Microplaque du kit

2 Ajouter 100 µL de conjugué



Microplaque du kit

3 Ajouter 100 µL de TMB

4 Ajouter 50 µL de solution d'arrêt

5 Enregistrer les densités optiques

* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.

Contact us
support.immuno@biox.com
www.biox.com
+32 (0) 84 32 23 77
Bio-X Diagnostics
38, rue de la Calestienne
5580 Rochefort (Belgium)