



MONOSCREEN[®] Ag ELISA

Notice d'utilisation
BIOK267-CPBT_NO_(FR)_V03
06/06/2024

Monoscreen AgELISA *Clostridium perfringens* toxine Bêta

Référence : BIO K 267

Test ELISA antigénique pour la détection de la toxine Bêta de *Clostridium perfringens*

Bicupule, test sandwich

Usage in vitro et strictement vétérinaire



Echantillon / dilution	Toutes espèces
Surnageants de culture / 1X	✓
Fluides biologiques / 2X	✓

Présentation

Référence produit	BIO K 267/2
Format	2 plaques, barrettes de 8 puits
Réactions	96 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 267/2
Microplate	Microplaques	2
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 x 100 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (5X)	1 x 50 mL
TMB solution	Solution TMB mono-composant (1X)	1 x 25 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 x 15 mL
Conjugate	Conjugué (1X)	1 x 25 mL
CTL POS	Contrôle positif (1X)	1 x 4 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
06/06/2024	V03	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice

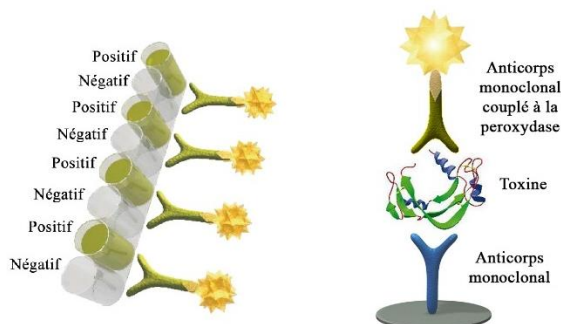
Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions

A. Introduction

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'entérotaxémie ovine (struck) et de la maladie du rein pulpeux du mouton. Elle est également l'agent causal de l'entérotaxémie 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'entérotaxémie. 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 fonctionne avec du surnageant de culture ou avec des fluides biologiques (liquide péricardique ou péritonéal).

B. Principe du test

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de la toxine Bêta de *Clostridium perfringens* tandis que les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) 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 Bêta 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 contrôle positif est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.



C. Matériel supplémentaire et équipement requis non fournis

- Eau distillée/déminéralisée.
- Microplaques de dilution.
- Pipette mono ou multicanaux de précision (gamme 2-20 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL) et embouts à usage unique.
- Lecteur de microplaque (filtre 450nm).
- Laveur de microplaque.
- Incubateur à 21±3°C.
- Matériel de laboratoire standard : cylindre gradué, béchers, tubes, portoirs...

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 à diluer 5 fois dans de l'eau distillée/déminéralisée. La solution de dilution est colorée en jaune. Elle est utilisée pour la dilution des fluides biologiques.
- Le contrôle positif est prêt 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

- Diluer au 1/2 les **échantillons biologiques** dans la solution de dilution.
Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, on peut y ajouter des billes de verre et agiter vigoureusement.
- Les **surnageants de culture** sont utilisés non dilués.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des cultures réalisées en milieu TGY en condition anaérobie à 37°C. Pour la toxine Bêta, on réalise une culture de minimum 8 heures ou plus à 37°C sans agitation.

Composition du milieu de culture liquide TGY :

- Trypticase (peptone tryptique de caséine)	30g
- Extrait de levure	20g
- Glucose	1g
- L-cystéine	1g

Dissoudre le trypticase et l'extrait de levure dans 950 mL d'eau et autoclaver. Dissoudre le glucose et la L-cystéine dans 50 mL d'eau et filtrer stérilement. Lorsque les 950 mL de milieu sont refroidis, ajouter les 50 mL de glucose et de L-cystéine.

G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à $21 \pm 3^\circ\text{C}$ avant utilisation.
- Lire attentivement les points précédents.
 1. Distribuer les **échantillons biologiques dilués**, les **surageants de culture non dilués** et le **contrôle positif non dilué** à raison de **100µL** par puits. Couvrir et incuber la plaque à **$21 \pm 3^\circ\text{C}$** pendant **$60 \pm 5\text{min}$** .
 2. Éliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Éviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
 3. Distribuer le **conjugué** à raison de **100µL** par puits. Couvrir et incuber la plaque à **$21 \pm 3^\circ\text{C}$** pendant **$60 \pm 5\text{min}$** .
 4. Éliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Éviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
 5. Distribuer **100µL** de la solution de **TMB** par puits. Incuber à **$21 \pm 3^\circ\text{C}$** pendant **$10 \pm 1\text{min}$** à l'abri de la lumière, sans couvrir.
 6. Distribuer la **solution d'arrêt** à raison de **50µL** 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 **450nm** dans les **5 minutes** après l'ajout de la solution d'arrêt.

H. Validation des résultats

Le test ne peut être **validé** que si :

- Le **contrôle positif** fournit une différence de densité optique en 10 minutes **supérieure à la valeur** indiquée sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

I. Interprétation des résultats

Calculer les delta Densité Optique (DO) en soustrayant de chaque valeur enregistrée sur les lignes impaires (A, C, E, G) le signal des puits témoins négatifs correspondants (B, D, F, H) et noter le résultat obtenu. (Tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives).

Procéder de même pour le contrôle positif.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

En utilisant le premier tableau repris dans le contrôle de qualité, déterminer le statut des échantillons (positif ou négatif).

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

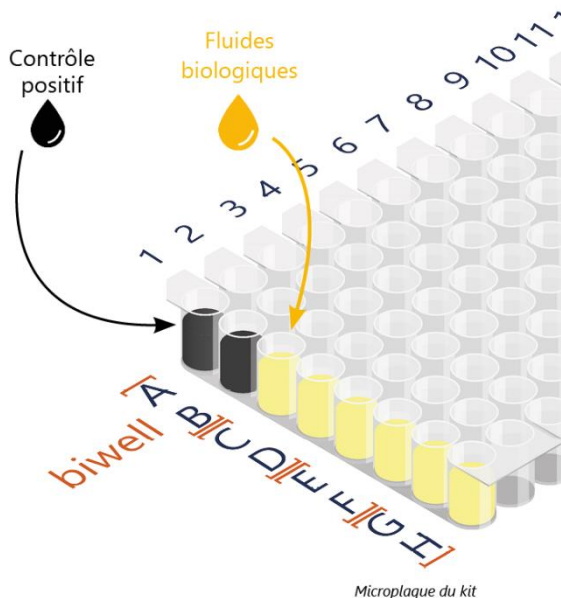
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : <https://www.biox.com>
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de plaques Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

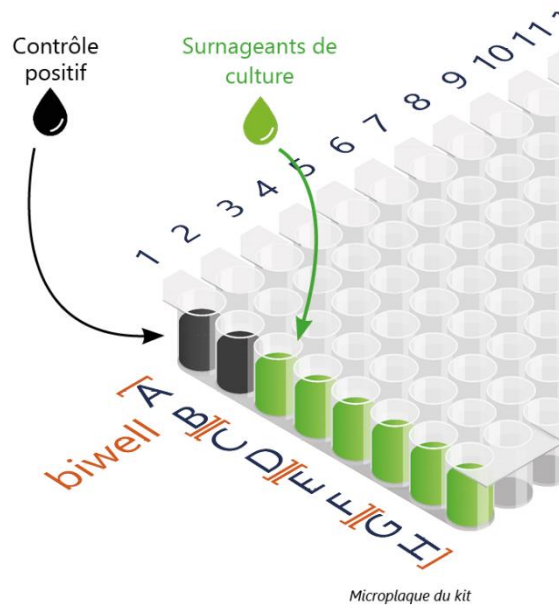
Protocole fluides biologiques

- 1 Distribuer 100 μ L des échantillons dilués 1/2
Distribuer 100 μ L de contrôle positif



Protocole surnageants de culture

- 1 Distribuer 100 μ L des échantillons non dilués
Distribuer 100 μ L de contrôle positif



Protocole commun

- 2 Ajouter 100 μ L de conjugué



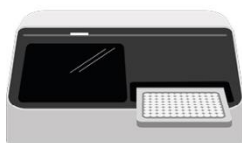
- 3 Ajouter 100 μ L de TMB



- 4 Ajouter 50 μ L de solution d'arrêt

- 5 Enregistrer les densités optiques

450 nm



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