



MONOSCREEN[®] Quant ELISA

Gamma interferon bovin

Test ELISA pour le dosage semi-quantitatif
de l'interferon gamma bovin

Test sandwich pour sérums sanguins et plasmas

Test diagnostique pour bovins

Monocupule

I – PRINCIPE DU TEST

Le test utilise des plaques de 96 puits sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de l'interferon gamma bovin. Cet anticorps permet la capture spécifique de l'interferon gamma présent dans l'échantillon (plasma ou sérum sanguin). L'entièreté de la plaque est sensibilisée par l'anticorps. Les échantillons sont incubés sans dilution sur la microplaque (1 heure à 21°C +/- 3°C). Une courbe de référence est préparée par dilution du standard fourni dans la trousse. Ce standard est un surageant de lymphocytes bovins stimulés "in vitro" par la concanavaline A. Comme aucun standard international n'existe pour l'interferon gamma, le standard de la trousse est calibré en unités arbitraires. A l'issue de la première incubation, la plaque est lavée et incubée 1 heure avec le conjugué, un anticorps spécifique de l'interferon gamma bovin couplé à la peroxydase. Après cette seconde incubation, la plaque est à nouveau lavée et l'on ajoute la solution de révélation (TMB monocomposant). Ce chromogène a l'avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérogène. La réaction enzymatique est ensuite bloquée par acidification et la densité optique des puits est lue à 450 nm à l'aide d'un photomètre pour microplaques. Les densités optiques obtenues pour les échantillons inconnus sont reportés sur la courbe de calibration de manière à déterminer leur concentration en unité arbitraire.

II - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : 2 microplaques de 96 puits. L'entièreté des microplaques est sensibilisée avec l'anticorps monoclonal spécifique de l'interferon gamma bovin.
- **Solution de lavage** : 1 flacon de 100 ml 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 50 ml de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois. En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire. Diluer 5 fois le tampon dans de l'eau distillée ou

déminéralisée. Stocker la solution diluée entre +2°C et +8°C . En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.

- **Conjugué** : 1 flacon de 0,5 ml de conjugué anti-interferon gamma bovin: (anticorps monoclonal anti-interferon gamma bovin couplé à la peroxydase de raifort). Le conjugué se conserve entre +2°C et +8°C. Le réactif doit être dilué au 1/50 dans le tampon de dilution.
- **Standard** : 2 flacons contenant le standard. Reconstituer ce réactif avec 0,5 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Après reconstitution, le standard se conserve à -20°C. Répartir ce réactif en aliquots avant de le congeler afin d'éviter les cycles de congélation-décongélation. Si ces précautions sont respectées, le réactif peut être conservé plusieurs mois.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de 25 ml de TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière. Prêt à l'emploi.
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon de 15 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 093/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 x 100 ml (20x)
Tampon de dilution (coloré)	1 x 50 ml (5x)
Conjugué	1 x 0,5 ml (50x)
Standard	2 x 0,5 ml (lyophilisés)
Solution TMB mono-composant	1 x 25 ml (1x)
Solution d'arrêt	1 x 15 ml (1x)

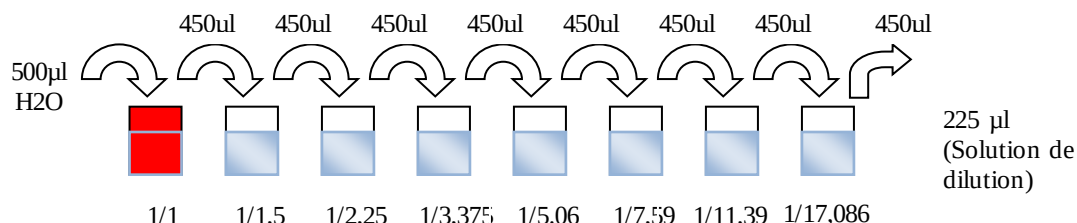
III - PRECAUTIONS D'UTILISATION

- 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 et le tampon de dilution concentrés peuvent être stockés à température ambiante. Après dilution, ces solutions ont 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 trousses.
- 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.

IV – MODE OPERATOIRE

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C .
- 2- Diluer la solution de lavage concentrée 20 fois dans de l'eau distillée. Assurez-vous que tous les cristaux de sel soient disparus avant d'entreprendre la dilution.
Diluer le tampon de dilution 5 fois dans de l'eau distillée. Stocker ces deux solutions entre +2°C et +8°C.
Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Préparer la courbe de calibration de la façon suivante: suspendre le contenu d'un flacon de standard dans 500 µl d'eau distillée. Réaliser avec précision 7 dilutions d'ordre 1,5 du standard dans la solution de dilution. La précision du test ELISA dépend en grande partie du soin apporté à la préparation de ces dilutions. Pour obtenir des résultats fiables, il est vivement conseillé d'utiliser un diluteur de précision équipé par exemple de seringues Hamilton. En cas d'utilisation d'une pipette manuelle, il est nécessaire de changer de pointe entre chaque dilution.

	Dilution	Concentration
Solution stock	1/1	100 UA/ml
1° dilution	1/1,5	66,66 UA/ml
2° dilution	1/2,25	44,44 UA/ml
3° dilution	1/3,375	29,63 UA/ml
4° dilution	1/5,0625	19,75 UA/ml
5° dilution	1/7,59375	13,17 UA/ml
6° dilution	1/11,390625	8,78 UA/ml
7° dilution	1/17,0859375	5,85 UA/ml



Distribuer en double les 8 dilutions sur la microplaque (100 µl par puits).

- 4- Distribuer les échantillons inconnus en simple et sans dilution sur la microplaque (100 µl par puits). Prévoir 1 puits blanc (solution de dilution).
- 5- Couvrir et incubé la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 6- 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.
- 7- Diluer au 1/50 le conjugué dans la solution de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 250 µl de la solution mère de conjugué dans 12,25 ml de solution de dilution). Distribuer la solution diluée de conjugué à raison de 100 µl par puits. Couvrir et incubé 1 heure à 21°C +/- 3°C.
- 8- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 9- Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur (TMB) doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette.
- 10- 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.
- 11- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 12- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un photomètre 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.

V – INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour calculer les concentrations en interféron gamma dans des échantillons biologiques, il est préférable d'utiliser un programme informatique doté d'une option de lissage de courbes du type Log/Logit ou du type "4 paramètres". Le programme Deltasoft de la firme Biomettals inc (P.O. Box 2251 Princeton, NJ USA Tel: 08543 609.275.0133 Fax 609.275.9485) est particulièrement bien adapté pour réaliser ce type de calcul. Si un tel programme est disponible, introduire les 8 concentrations en unités arbitraires de la courbe de calibration (2 valeurs par dilution). Nommer chaque échantillon. Le programme calculera les 4 paramètres de l'équation de la courbe de calibration ainsi que son coefficient de corrélation. Interpolez les valeurs de manière à obtenir les concentrations des échantillons inconnus.

Si un programme tel que Deltasoft n'est pas disponible, on peut déterminer les concentrations des échantillons inconnus en utilisant la méthode graphique. Procédez de la façon suivante:

Utilisez le graphique fourni avec la trousse. Les lignes verticales en gras correspondent aux concentrations de la courbe standard (100 UA/ml – 5,85 UA/ml). Calculez pour chacun des 8 points de la courbe de calibration la moyenne des densités optiques. Placez sur chacune de ces 8 lignes verticales les valeurs ainsi calculées. Tracez ensuite la courbe de manière à ce qu'elle s'adapte au mieux aux 8 points expérimentaux. Pour chaque échantillon inconnu, reporter sur l'ordonnée les densités optiques des échantillons et tracez les lignes horizontales correspondantes. Au point d'intersection des lignes horizontales avec la courbe, tracez des lignes verticales et déterminez les concentrations des échantillons sur l'abscisse (UA/ml).

VIII – POUR COMMANDER

QuantELISA Gamma interferon bovin

2 X 80 tests BIO K 093/2

