



MONOSCREEN[®] Quant ELISA

Haptoglobine bovine

Test ELISA pour le dosage quantitatif de l'Haptoglobine bovine

Test sandwich pour sérums sanguins et laits

Test diagnostique pour bovins

I - INTRODUCTION

L'haptoglobine est une glycoprotéine synthétisée par les hépatocytes au cours de la phase aiguë de la réaction inflammatoire. Cette protéine possède la capacité de fixer l'hémoglobine. Le taux plasmatique de l'haptoglobine peut augmenter lors de certains processus inflammatoires (brûlures, allergies, traumatismes, boiteries, troubles infectieux etc...). En cas de mammite, la concentration en haptoglobine dans le lait peut également augmenter dans des proportions très importantes. On estime que la limite supérieure du taux d'haptoglobine dans le sérum sanguin ou le plasma est de 100 µgr/ml tandis que dans le lait la limite est de 0,5 µgr/ml.

II - PRINCIPE DU TEST

Le test utilise des plaques de 96 puits sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de l'haptoglobine bovine. Cet anticorps permet la capture spécifique de la protéine présente dans l'échantillon (sérum sanguin, lait). L'entièreté de la plaque est sensibilisée par l'anticorps. Les échantillons prédilués sont incubés sur la microplaque (1 heure à 21°C +/- 3°C). Une courbe de référence est préparée par dilution du standard fourni dans la trousse. A l'issue de la première incubation, la plaque est lavée et incubée 1 heure avec le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique de l'haptoglobine bovine couplé à la peroxydase. Après cette seconde incubation, la plaque est à nouveau lavée et le chromogène (la tétraméthylbenzidine TMB) est ajouté. 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 spectrophotomètre pour microplaques. Les densités optiques obtenues pour les échantillons inconnus sont reportées sur la courbe de calibration de manière à déterminer leur concentration en ngr/ml.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : 1 microplaque de 96 puits. L'entièreté de la microplaque est sensibilisée avec l'anti-haptoglobine bovine.
- **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.
- **Calibrateur** : 1 flacon de 500 µl lyophilisé.
- **Conjugué** : 1 flacon de 12 ml de conjugué anti-haptoglobine bovine. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de 12 ml 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 6 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 328/1
Microplaque	1
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 12 ml (1 X)
Calibrateur	1 X 0,5 ml lyophilisé
Solution TMB mono-composant	1 X 12 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 6 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 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 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.
- 2- Diluer la solution de lavage 20 X dans de l'eau distillée. S'assurer que tous les cristaux ont disparu avant d'utiliser la solution diluée. Diluer le tampon de dilution 5 X dans de l'eau distillée. Conserver les 2 solutions entre +2°C. et +8°C. lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- 3- Préparer la courbe de calibration de la façon suivante : Ajouter précisément 500 µl d'eau distillée au contenu du calibrateur. Lorsque la poudre est complètement dissoute et que le liquide est bien homogène, prélever précisément 150 µl et ajouter 1350 µl de solution de dilution (dilution du calibrateur au 1/10). Préparer ensuite

la courbe de calibration comme indiqué dans le tableau suivant. Il est possible d'aliquoter le reste du calibrateur sérique (350 µl) en fractions précises de 150 µl et de les congeler à -20°C pour des utilisations ultérieures. Ces fractions de 150 µl ne peuvent être décongelées qu'une seule fois.

Calibrateur	300 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Sol dilution		150 µl	450 µl	1,05 ml	2,25 ml	4,65 ml	9,45 ml
Dilution	1 :1	1 :2	1 :4	1 :8	1 :16	1 :32	1 :64
Concentration	360 ng/ml	180 ng/ml	90 ng/ml	45 ng/ml	22,5 ng/ml	11.25 ng/ml	5.6 ng/ml

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.

- 4- Dilution des échantillons inconnus. Préparer les dilutions des échantillons inconnus en solution de dilution. Prévoir au minimum 200 µl par dilution (100 µl par puits). Le facteur de dilution appliqué va dépendre de la concentration approximative en haptoglobine des échantillons. En effet, il est crucial que la densité optique obtenue avec les échantillons à doser se situe entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse de la courbe de calibration. Idéalement, la densité optique enregistrée pour un échantillon inconnu devrait être proche du point d'inflexion de la courbe de calibration. Pour déterminer approximativement combien diluer les échantillons inconnus, utiliser les valeurs reprises dans le tableau suivant :

Facteur de dilution

Lait bovin : 1/10
Sérum sanguin : 1/1000

Pour les échantillons sériques provenant d'animaux dont l'examen clinique permet d'anticiper l'existence d'un foyer inflammatoire (mammite, boiterie, arthrite, métrite etc...) il est préférable d'appliquer un facteur de dilution de 3000 plutôt que de 1000. Tenir compte de ce facteur de dilution lors du calcul de la concentration.

- 5- Distribuer les 7 dilutions de la courbe de calibration sur la microplaque (100 µl par puits) de même que les échantillons inconnus prédilués. Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une 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- Distribuer le conjugué à raison de 100µl par puits. Couvrir et incuber la plaque 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 doit être parfaitement incolore. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette. Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité.
Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
- 10-Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 11-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

Pour calculer les concentrations en haptoglobine des échantillons inconnus, 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". Si un tel programme est disponible, introduire les 7 concentrations de la courbe de calibration.

Nommez chaque échantillon et indiquez sa dilution. 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.

De nombreux sites internet permettent de calculer gratuitement des courbes du type « 4 paramètres » tel que :

- <https://www.myassays.com>
- <http://elisaanalysis.com>
- <https://www.mycurvefit.com>

VIII – POUR COMMANDER

QuantELISA Haptoglobine bovine:

1 X 96 tests

BIO K 328/1

