



MULTISCREEN[®] Ag ELISA

Notice d'utilisation
BIOK270-Enterotoxemia_NO_(FR)_V03
04/07/2022

Multiscreen AgELISA Enterotoxemia

Référence : BIO K 270

Test ELISA de détection de *Clostridium perfringens* et des toxines Bêta, Thêta et Epsilon

Bicupule, sandwich

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Toutes espèces
Surnageants de culture	✓
Fluides biologiques	✓

Présentation

Référence produit	BIO K 270/2
Format	2 plaques, barrette de 8 puits
Réactions	24 tests

Composition du kit

Matériel fourni	BIO K 270/2
Microplaque	2
Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Solution de dilution colorée (5X)	1 X 50 mL
Conjugué thêta toxine (1X – rouge)	1 X 6 mL
Conjugué beta toxine (1X – jaune)	1 X 6 mL
Conjugué epsilon toxine (1X – bleu)	1 X 6 mL
Conjugué Clos. Perf. (1X – vert)	1 X 6 mL
Contrôle positif (1X)	1 X 4 mL
Solution de TMB monocomposant (1X)	1 X 25 mL
Solution d'arrêt (1X)	1 X 15 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
04/07/2022	V03	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice Remplacement de la toxine alpha par la toxine thêta

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 pathologie le plus fréquemment aiguë, voire suraiguë, caractérisée par la résorption dans la circulation sanguine de toxines élaborées dans l'intestin. Leur production fait suite à une prolifération dans l'intestin, dans des circonstances souvent mal connues, de la bactérie qui en est à l'origine, *Clostridium perfringens*. Cette dernière est une bactérie Gram positive, en forme de bâtonnet, anaérobie, sporulée. Elle est responsable d'un grand nombre de pathologies à la fois chez l'homme et chez l'animal. Cette espèce bactérienne cosmopolite se trouve dans le tube digestif de toutes les espèces animales et de l'homme ainsi que dans le sol, l'eau et l'air. La virulence de *Clostridium perfringens* est associée à la production de différentes exotoxines. Quatre d'entre elles, Alpha, Bêta, Epsilon et Iota sont appelées les toxines létales majeures, car elles entraînent la mort de la souris après injection par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Les souches de *Clostridium perfringens* sont ainsi classées en 5 toxinotypes (A, B, C, D, E) suivant la combinaison des toxines létales produites.

Le diagnostic bactériologique d'entérotoxémie ne peut se contenter de l'isolement de la bactérie, mais doit s'accompagner d'une analyse quantitative et d'un typage des souches bactériennes isolées pour rechercher les toxines. La trousse ELISA entérotoxémie de Bio-X permet de réaliser un toxinotypage phénotypique par dosage des toxines **Alpha***, Bêta et Epsilon. La trousse permet également une évaluation semi-quantitative de la croissance de *Clostridium perfringens* par dosage d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. La trousse peut être utilisée avec des cultures de *Clostridium perfringens* ou directement à partir d'échantillons biologiques (liquides péricardique ou péritonéal prélevés sur des cadavres, liquide intestinal).

**Des analyses menées récemment par spectrométrie de masse nous ont permis de démontrer que l'anticorps monoclonal utilisé dans ce kit n'est pas spécifique de la toxine alpha mais de la toxine thêta ainsi que d'une protéase.*

*Comme la toxine thêta est pratiquement toujours associée à la toxine alpha, la finalité de ce kit diagnostic des enterotoxémies n'est pas affectée par cette avancée analytique. De plus, la toxine thêta étant moins sensible à l'effet des protéases que la toxine alpha, elle constitue un marqueur plus sensible de *Clostridium perfringens* et reste donc privilégiée dans ce kit dont la constitution demeure inchangée.*

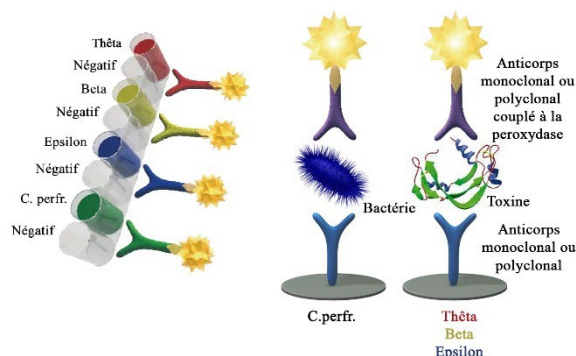
B. Principe du test

Les lignes A, C, E et G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par des anticorps spécifiques des toxines Bêta, Thêta et Epsilon de *Clostridium perfringens* et par un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. Ces anticorps assurent la capture des toxines à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (milieu de culture, contenu intestinal, liquide cavitaire, ...). Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F et H) ont été sensibilisées avec des anticorps non spécifiques. On dispose de la sorte de témoins négatifs véritables qui permettent de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. L'utilisation de tels témoins permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les échantillons biologiques sont dilués dans le tampon de dilution, les surnageants de culture sont utilisés purs et incubés durant une heure sur la microplaque. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute les conjugués, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques des toxines Bêta, Thêta et Epsilon couplés à la peroxydase ou un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie couplée également à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 d'une ou de plusieurs toxines dans l'échantillon, le ou les conjugués restent fixés sur la ou les cupules correspondantes 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. Si l'échantillon contient une quantité importante de bactéries, le puits spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par *Clostridium perfringens* donne également un signal positif.

Les signaux enregistrés sur les cupules négatives sensibilisées avec les anticorps témoins sont retranchés des signaux des cupules correspondantes positives sensibilisées par les anticorps spécifiques. Un antigène de contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

Toxinotypes	Alpha	Thêta	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 $+8^{\circ}\text{C}$.
- 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 trousse.
- 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 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 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.
- Les conjugués sont prêts 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 cavitaires, ...) 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 la toxine Thêta est de 4 heures ou tout au moins jusqu'à la production maximale de gaz. Pour les toxines Bêta et Epsilon, on réalise une culture de minimum 8 heures voire une nuit complète. Lorsqu'on ne dispose d'aucune information concernant la souche, il est préférable de l'incuber 8 heures à 37°C sans agitation.

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 échantillons, il est possible de préparer les dilutions des échantillons et de distribuer le contrôle positif ou de distribuer les surnageants de culture dans une microplaque de dilution avant leur transfert (100 µL) dans la microplaque du kit à l'aide d'une pipette multicanaux.

- Distribuer les échantillons biologiques **dilués**, le contrôle positif du kit **prêt à l'emploi** et les surnageants de culture **non-dilués** à raison de **100 µL par puits** et un échantillon ou contrôle positif **par colonne** (expl : échantillon n°1 sur les puits A1 à H1). Couvrir avec un couvercle et incuber la plaque à **21 ± 3°C** pendant **60 ± 5 min**.
- 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.
- Ajouter **100 µL de conjugué prêt à l'emploi** par puits.

Conjugué	Répartition
Conjugué thêta toxine (1X – rouge)	Ligne A-B
Conjugué beta toxine (1X – jaune)	Ligne C-D
Conjugué epsilon toxine (1X – bleu)	Ligne E-F
Conjugué Clos. Perf. (1X – vert)	Ligne G-H

Couvrir avec un couvercle et incuber la plaque à **21 ± 3°C** pendant **60 ± 5 min**.

- 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.
- 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.
- Distribuer la solution d'arrêt à raison de **50 µL** par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 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 pour chacune des toxines et *Clostridium perfringens*.

Contrôle + / toxine thêta : DO ligne A – DO ligne B > QC

Contrôle + / toxine beta : DO ligne C – DO ligne D > QC

Contrôle + / toxine epsilon : DO ligne E – DO ligne F > QC

Contrôle + / toxine Clos. perf. : DO ligne G – DO ligne H > QC

I. Interprétation des résultats

Calculer pour chaque échantillon son coefficient (E/P %) pour chacune des toxines et *Clostridium perfringens* au moyen de la formule suivante :

$$E/P \text{ Thêta } (\%) = \frac{DO \text{ échantillon ligne A} - DO \text{ échantillon ligne B}}{DO \text{ contrôle positif ligne A} - DO \text{ contrôle positif ligne B}} * 100$$

$$E/P \text{ Beta } (\%) = \frac{DO \text{ échantillon ligne C} - DO \text{ échantillon ligne D}}{DO \text{ contrôle positif ligne C} - DO \text{ contrôle positif ligne D}} * 100$$

$$E/P \text{ Epsilon } (\%) = \frac{DO \text{ échantillon ligne E} - DO \text{ échantillon ligne F}}{DO \text{ contrôle positif ligne E} - DO \text{ contrôle positif ligne F}} * 100$$

$$E/P \text{ Clos. p. } (\%) = \frac{DO \text{ échantillon ligne G} - DO \text{ échantillon ligne H}}{DO \text{ contrôle positif ligne G} - DO \text{ contrôle positif ligne H}} * 100$$

	Résultats	Statut
Echantillon	Theta E/P % < x* %	Négatif
	Theta E/P % ≥ x* %	Positif
	Beta E/P % < x* %	Négatif
	Beta E/P % ≥ x* %	Positif
	Epsilon E/P % < x* %	Négatif
	Epsilon E/P % ≥ x* %	Positif
	Clos. perf. E/P % < x* %	Négatif
	Clos. perf. 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 :

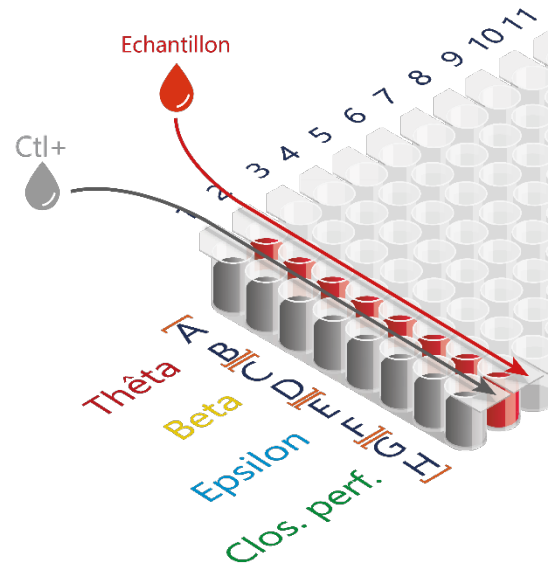
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : <https://www.biox.com>
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de Plaques BioX Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

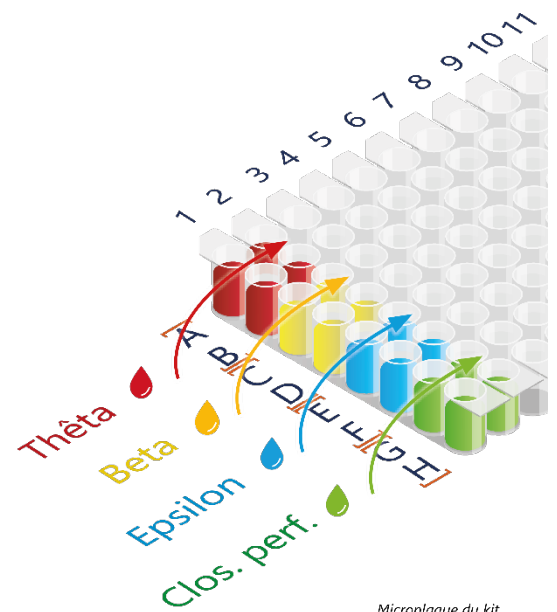
Notes*

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



Microplaque du kit

- 2 Ajouter 100 μ L de conjugué



Microplaque du kit

- 3 Ajouter 100 μ L de TMB



- 4 Ajouter 50 μ L de solution d'arrêt

- 5 Enregistrer les densités optiques



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