



MONOSCREEN[®] Ag ELISA

***Clostridium perfringens* toxine Alpha**

Test ELISA antigénique pour la détection
de la toxine Alpha de *Clostridium perfringens*
Test sandwich pour surnageant de culture et fluides biologiques
Test diagnostique toutes espèces
Bicupule

I - 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'immunsérums 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.

II - PRINCIPE DU TEST

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps polyclonal spécifique de la toxine Alpha de *Clostridium perfringens* tandis que les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) ont été sensibilisées avec un anticorps polyclonal 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 le tampon 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 polyclonal témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps polyclonal spécifique de la toxine. Un antigène de contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

TOXINOTYPES

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

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : microplaque de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps spécifique de la toxine Alpha et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin (anticorps polyclonal non spécifique).
- **Solution de lavage** : flacon 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.
- **Tampon de dilution** : flacon 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. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : flacon de conjugué anti-toxine Alpha de *Clostridium perfringens* couplé à la peroxydase de raifort. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Antigène de contrôle** : flacon contenant l'antigène de contrôle. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB mono-composant** : flacon 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** : flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 266/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 25 ml (1 X)
Antigène de contrôle	1 X 4 ml (1 X)
Solution TMB mono-composant	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 15 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 dessiccant 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- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer au demi les échantillons biologiques dans le tampon de dilution (tube à essai). Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, on peut ajouter dans le récipient des billes de verre et déliter le contenu intestinal en agitant vigoureusement l'ensemble. Les surnageants de culture sont utilisés non dilués. 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 Alpha est de 4 heures ou tout au moins jusqu'à la production maximale de gaz. Lorsqu'on ne dispose d'aucune information concernant la souche, il est préférable de l'incuber 4 heures à 37°C sans agitation.

Composition du milieu de culture liquide TGY:

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

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.

- 4- Distribuer les échantillons biologiques dilués et les surnageants de culture non dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante: échantillon 1: puits A1 à B1; échantillon 2: puits C1-D1, etc... Distribuer l'antigène de contrôle de la même manière (exemple : puits E1-F1).
- 5- Couvrir et incuber 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 brutalement au-dessus d'un évier. Tapoter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. A l'aide d'une pissette ou par immersion dans un récipient de dimension adéquate, remplir les cupules utilisées avec la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus d'un évier. 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.
L'utilisation d'un laveur de plaques (automatique ou manuel) est également conseillée. Il est cependant nécessaire de régler la profondeur d'immersion des aiguilles de manière à ne pas altérer la couche de réactifs adsorbés sur le fond des puits.
- 7- Distribuer le conjugué à raison de 100 µl par puits. Couvrir et incuber 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 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.
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 50 µl de solution d'arrêt 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 – INTERPRETATION DES RESULTATS

Soustraire 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 (calcul des delta D.O.). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives. Procéder de même pour le contrôle positif. Le test ne peut être validé que si la référence positive fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure à la valeur indiquée sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

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).

VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AgELISA *Clostridium perfringens* toxine alpha : 2 X 48 tests BIO K 266/2

