

Monoscreen AbELISA Mycoplasma bovis HS

Référence : BIO K 432

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de *Mycoplasma bovis*

Monocupule, test indirect

Usage in vitro et strictement vétérinaire



Echantillon / dilution	Bovin
Sérum sanguin – plasmas* / 100X	✓
Lait écrémé/non écrémé / 1X	✓

*Par la suite, nous retiendrons la dénomination sérum.

Présentation

Référence produit	BIO K 432/2	BIO K 432/5
Format	2 plaques, barrettes de 8 puits	5 plaques, barrettes de 8 puits
Réactions	192 tests	480 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 432/2	BIO K 432/5
Microplate	Microplaques	2	5
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 x 100 mL	1 x 250 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (5X)	1 x 50 mL	2 x 100 mL
TMB solution	Solution de TMB Monocomposant (1X)	1 x 25 mL	1 x 55 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 x 15 mL	1 x 30 mL
Conjugate	Conjugué (50X)	1 x 0,5 mL	1 x 1,4 mL
CTL POS	Contrôle positif	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
CTL NEG	Contrôle négatif	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Tracer	Traceur	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
26/09/2024	V02	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice. Et ajout de la matrice lait.

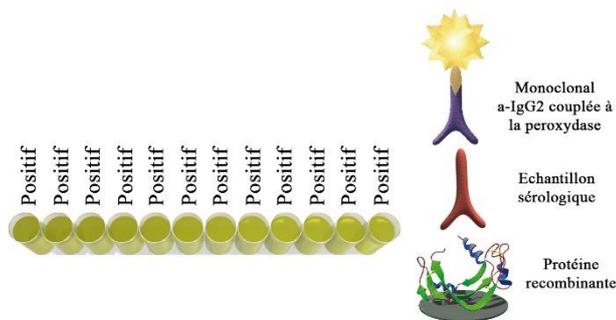
Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions

A. Introduction

Mycoplasma bovis est associé à de multiples pathologies des bovidés parmi lesquelles des arthrites, des pneumonies du veau et du jeune bétail, des mammites et des infections de la sphère génitale. Les pneumonies infectieuses qui affectent les veaux en élevage intensif sont responsables de pertes économiques importantes à cause des mortalités, des coûts des traitements et des retards de croissance qu'elles occasionnent. Ces affections respiratoires sont souvent plurifactorielles et elles sont causées par des interactions entre des virus, des Mycoplasmes et des bactéries. Plusieurs espèces de Mycoplasmes ont pu être isolées du tractus respiratoire du veau. Certaines sont plus que probablement de simples commensaux ou opportunistes qui ne font qu'étendre les dommages pulmonaires occasionnés par d'autres agents. *Mycoplasma bovis* a été isolé du poumon de veaux atteints de pneumonie et c'est probablement l'espèce la plus pathogène qui touche le bétail exception faite toutefois de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Mycoplasma bovis* peut induire des pneumonies chez des veaux gnotobiotiques. On retrouve fréquemment *Mycoplasma bovis* associé à *Mannheimia haemolytica* lors de pneumonies chez le veau.

B. Principe du test

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un antigène recombiné de *Mycoplasma bovis* exprimé par la bactérie *E. coli*. L'entière des microplaques est sensibilisée par l'antigène recombiné. Les sérums sanguins et les plasmas sont dilués dans la solution de dilution. Les laits sont utilisés purs. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, un anticorps anti-IgG2 bovines 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 Monocomposant). 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'immunoglobulines spécifiques de *Mycoplasma bovis* dans l'échantillon, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant l'antigène recombiné et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques présents dans l'échantillon.



C. Matériel supplémentaire et équipement requis non fournis

- Eau distillée/déminéralisée.
- Microplaques de dilution.
- Pipette mono ou multicanaux de précision (gamme 2-20µL, 20-200 µL et 100-1000µL) 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 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±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 échantillons, des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) et du conjugué.
- Le conjugué est à diluer 50 fois dans la solution de dilution.
- La solution d'arrêt est prête à l'emploi.
- La solution de TMB est prête à l'emploi. Elle doit être parfaitement incolore.
- Le traceur est un échantillon de référence qui peut être utilisé pour contrôler la reproductibilité intra-laboratoire du lot de la trousse. Il est à diluer 100 fois dans la solution de dilution.

F. Préparation des échantillons

- Les échantillons de **sérum** et les témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) doivent être dilués **100 fois** dans la solution de dilution et homogénéisés. Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou coagulés.

Dilution recommandée :

10 µL d'échantillon + 990 µL de solution de dilution

- Pour écrémer les **laits**, les échantillons doivent être centrifugés 20 minutes à 4000g. Prélever le liquide intermédiaire en veillant à ne pas toucher le culot cellulaire sous-jacent. Les laits écrémés et non écrémés sont utilisés sans dilution.

G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à 21±3°C avant utilisation.
 - Lire attentivement les points précédents.
1. Distribuer les échantillons de **sérum dilués**, ou les **laits non dilués**, et les témoins du kit **dilués** à raison de **100 µL par puits**. Couvrir avec un couvercle et incubé la plaque à **21±3°C pendant 60 ± 5min**.
 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 dilué** à raison de **100 µL** par puits. Couvrir et incubé à **21±3°C pendant 60±5min**.
 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 **100 µL** de la solution de **TMB** par puits. Incuber à **21±3°C** pendant **10±1min** à l'abri de la lumière, sans couvrir.
6. Distribuer la solution d'arrêt à raison de **50 µL** 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 :

- La différence entre les lectures de densité optique (DO) du puits impair et du puits pair du contrôle positif est supérieure à 0,700.

Contrôle positif : $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} > 0,700$

- La différence entre les lectures de densité optique (DO) du puits impair et du puits pair du contrôle négatif est inférieure à 0,400.

Contrôle négatif : $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} < 0,400$

I. Interprétation des résultats

- Calculer pour chaque échantillon son coefficient en appliquant la formule suivante :

$$\text{Coef éch} = \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{contrôle négatif}}}{DO_{\text{contrôle positif}} - DO_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Utiliser le tableau ci-dessous pour interpréter les résultats des échantillons.

Type d'échantillon	Sérum	Lait
Cut-off (%)	80	40

Un échantillon est **négatif** si son coefficient est inférieur au cut-off lui correspondant.

Un échantillon est **positif** si son coefficient est supérieur ou égal au cut-off lui correspondant.

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 :

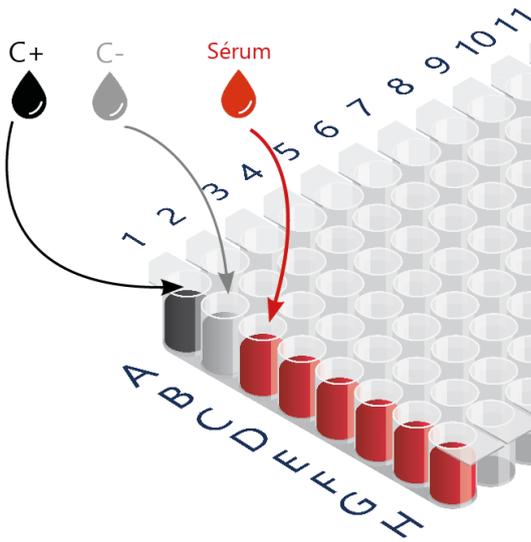
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : <https://www.biox.com>
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de plaques Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

Protocole sérum

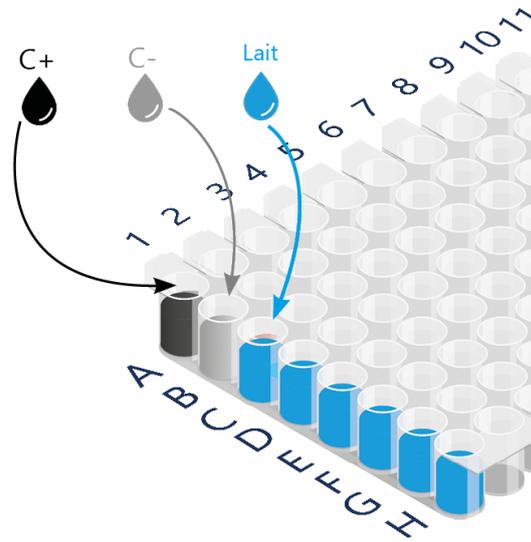
- 1 Dilution des échantillons 1/100
Dilution des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) 1/100



Microplaque du kit

Protocole lait

- 1 Distribuer les échantillons centrifugés
Dilution des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) 1/100



Microplaque du kit

Protocole commun

- 2 Ajouter 100 μ L de conjugué dilué (1/50)



- 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.