

MULTISCREEN Ag ELISA

Notice d'utilisation
 BIOK382-CPAT_NO_(FR)_V02
 20/11/2024

Multiscreen AgELISA toxine Alpha - Clostridium perfringens

Référence : BIO K 382

Test ELISA de détection de *Clostridium perfringens* et de la toxine Alpha

Bicupule, test sandwich

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon / Dilution	Toutes espèces
Surnageants de culture / 1X	✓
Echantillons biologiques / 2X	✓

Présentation

Référence produit	BIO K 382/2
Format	2 plaques, barrettes de 8 puits
Réactions	48 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 382/2
Microplate	Microplaques	2
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Dilution solution	Solution de dilution (5X)	1 X 50 mL
Conjugate anti-Alpha	Conjugué anti-Alpha toxine (1X - rouge)	1 X 12 mL
Conjugate anti-Clos.perf.	Conjugué anti-Clos.perf. (1X - vert)	1 X 12 mL
CTL POS	Contrôle positif (1X)	1 X 4 mL
TMB solution	Solution de TMB Monocomposant (1X)	1 X 25 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 X 15 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
20/11/2024	V02	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice.

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

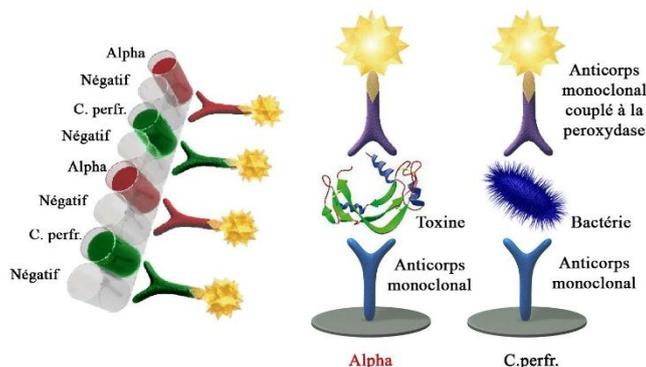
L'entérotoxémie est une pathologie le plus fréquemment aiguë, voir suraiguë, caractérisée par la résorption dans la circulation sanguine de toxines élaborées dans l'intestin. Leur production fait suite à une prolifération dans l'intestin, dans des circonstances souvent mal connues, de la bactérie qui en est à l'origine, *Clostridium perfringens*. Cette dernière est une bactérie Gram positive, en forme de bâtonnet, anaérobie stricte, 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 *C. perfringens* est associée à la production de différentes exotoxines. Quatre d'entre elles α , β , ϵ , ι , sont appelées les toxines létales majeures, car elles entraînent la mort de la souris après injection par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Les souches de *C. perfringens* sont ainsi classées en 5 toxinotypes (A, B, C, D, E) suivant la combinaison des toxines létales majeures 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 Multiscreen ELISA toxine Alpha – *Clostridium perfringens* de Bio-X permet de réaliser une détection de la toxine α . La trousse permet également un évaluation semi-quantitative de la croissance de *C. perfringens* par dosage d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. La trousse peut être utilisée avec des cultures de *C. perfringens* ou directement à partir d'échantillons biologiques (liquide intestinal).

B. Principe du test

Les lignes A et E de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de la toxine α de *C. perfringens*. Les lignes C et G ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. Ces anticorps assurent la capture de la toxine ou de la bactérie à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (milieu de culture, contenu intestinal, ...). Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) ont été sensibilisées avec des anticorps non spécifiques. Leur utilisation permet de limiter dans des proportions importantes les résultats faussement positifs. Les échantillons biologiques sont dilués dans la solution 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 dans les puits correspondants. Ces conjugués sont des anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase. Ils sont spécifiques de la toxine ou de *C. perfringens*. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à $21 \pm 3^\circ\text{C}$ 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 la présence de la toxine ou de l'agent pathogène recherché dans l'échantillon, le ou les conjugués correspondants restent fixés sur leurs cupules respectives 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 ou en agent pathogène de l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps spécifique. Un contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

Toxinotypes	Alpha	Bêta	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, ...
- Incubateur à $21 \pm 3^\circ\text{C}$.

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. La solution de dilution est colorée en jaune. Elle est utilisée pour la dilution des échantillons biologiques.
- Les conjugués sont prêts à l'emploi. A chaque valence correspond une couleur : anti-toxine alpha (rouge), et anti-*Clostridium perfringens* (vert).
- Le contrôle positif est prêt 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

- Les échantillons biologiques sont à diluer au demi dans la solution de dilution. 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 mélangeant l'ensemble. Ne pas centrifuger.

- Les **surageants de culture** sont utilisés non dilués.

Pour une détection optimale de la toxine Alpha, nous conseillons de réaliser une culture de 8h à 37°C en milieu TGY et conditions anaérobies (ex : dans un tube de 10 ml de milieu de culture, bien fermé, sans agitation). Au terme des 8h d'incubation, congeler la culture jusqu'à utilisation.

Le signal enregistré dans les cupules *C. perfringens* (C-D et G-H) permettra d'objectiver la présence de la bactérie ainsi que sa croissance.

Composition du milieu de culture liquide TGY :

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

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.

G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à **21 ± 3°C** avant utilisation.
 - Lire attentivement les points précédents.
- Distribuer les **échantillons biologiques dilués** et les **surageants de culture non dilués** à raison de **100 µL par puits** en respectant la disposition suivante, par exemple : échantillon 1 : puits A1 à D1 ; échantillon 2 : puits E1 à H1, etc... Et distribuer le contrôle positif dans les puits A2-D2. Couvrir 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 les conjugués prêts à l'emploi à raison de **100 µL** par puits.

Conjugué	Répartition
Conjugué anti-Alpha toxine (1X – rouge)	Ligne A-B, E-F
Conjugué anti- <i>Clos. Perf.</i> (1X – vert)	Ligne C-D, G-H

Couvrir 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. La solution doit être parfaitement incolore. 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 le contrôle positif fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure à la valeur indiquée sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

I. Interprétation des résultats

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.

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.

$$\text{Val (eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} \times 100}{\text{Delta DO pos}}$$

Déterminer le statut des échantillons 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™ est le nouveau module de lecture et d'interprétation de tous les types de plaques ELISA Monoscreen™ et Multiscreen™. **AnalysiScreen™** est :

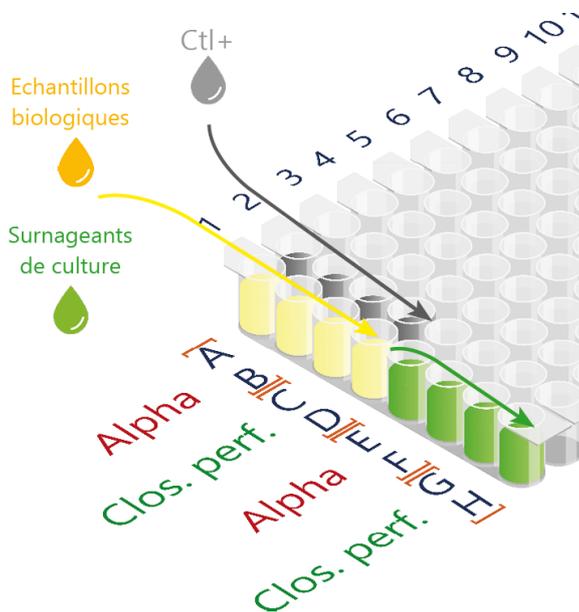
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : <https://www.biox.com>
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de Plaques BioX-Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

Notes*

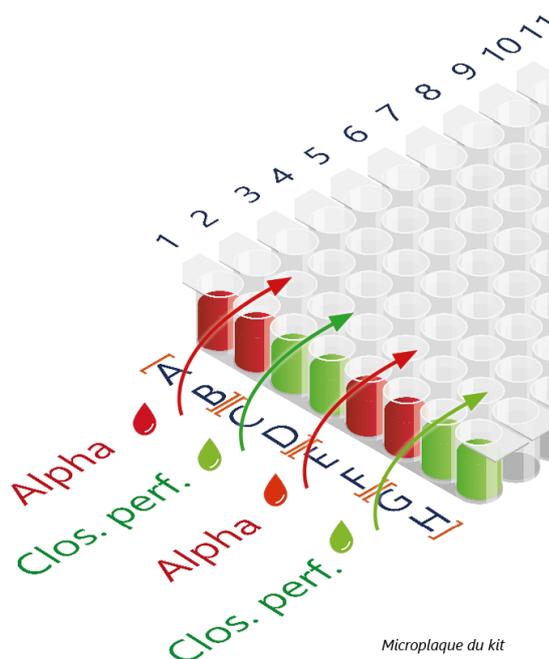
- 1 Dilution des échantillons biologiques 1/2
Surnageants de culture 1/1
Contrôle positif (Ctl+) 1/1



- 2 Ajouter 100 μ L de conjugué



Microplaque du kit



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.