

Monoscreen AbELISA *Besnoitia besnoiti*

Référence : BIO K 466

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de la besnoitiose bovine

Monocupule, test de blocage

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Espèce	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sérum sanguin	Bovin	✓	10

* Se fait conformément à la législation en vigueur de votre pays, à l'organisme certificateur ou aux recommandations faites par le LNR quand elles existent. Les mélanges doivent être fait volume à volume, c'est-à-dire être réalisés en prenant le même volume de chacun des sérums constituant le mélange.

Présentation

Référence produit	BIO K 466/2
Format	2 plaques, barrette de 8 puits
Réactions	192 tests

Composition du kit

Matériels fourni	BIO K 466/2
Microplaque	2
Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Solution de dilution coloré (1X)	1 X 60 mL
Conjugué (50X)	1 X 0,6 mL
Contrôle positif	3 X 0,5 mL
Contrôle négatif	3 X 0,5 mL
Solution de TMB monocomposant (1X)	1 X 25 mL
Solution d'arrêt (1X)	1 X 15 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
07/03/2022	V01	Première version
15/03/2022	V02	Ajout de colonnes « Analyse individuelle » et « Analyse en mélange*, possible jusqu'à »
19/09/2022	V03	Modification de la composition du kit

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

Besnoitia besnoiti, l'agent causal de la besnoitiose bovine, est un protozoaire intracellulaire strict. La maladie touche principalement les jeunes bovins. La besnoitiose est épizootique dans le sud de la France, mais elle est maintenant largement répandue en Afrique, en Asie et dans le sud-ouest de l'Europe. La voie de transmission la plus probable serait transcutanée, par des insectes piqueurs (tabanidés, stomoxes).

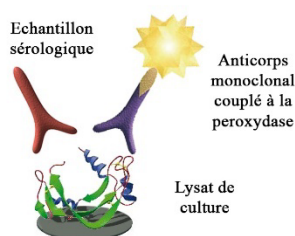
Au cours de l'infection, une phase d'incubation de 3 à 6 jours est suivie de 3 stades cliniques successifs :

- Un stade fébrile de 3 à 7 jours ; la multiplication des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins augmente la température de l'animal.
- Une deuxième phase de 1 à 2 semaines ; les kystes de bradyzoïtes génèrent un œdème sous-cutané.
- Une phase chronique de plusieurs mois, caractérisée par une alopecie et une sclérodémie. La peau devient alors nettement épaissie et ridée, et des kystes parasites sont observés sur la conjonctive et la sclérotique. Cette phase ultime conduit généralement à la mort de l'animal ou à son euthanasie.

B. Principe du test

Le test utilise des plaques de microtitration à 96 puits sensibilisés par le lysat de culture de *Besnoitia besnoiti*. Dans chaque puits, dépôt de 50 µL de solution de dilution 1X puis de 50 µL de sérum ou de témoins. Après 120 minutes d'incubation et une étape de rinçage, l'opérateur ajoute le conjugué, qui est un anticorps monoclonal spécifique de *Besnoitia besnoiti* couplé à une peroxydase. Après incubation et lavage de la préparation, l'opérateur ajoute le chromogène tétraméthylbenzidine (TMB).

Ce chromogène a l'avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes à peroxydase et de ne pas être cancérogène. La lecture est réalisée à 450 nm. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle au titre sérique de l'échantillon. Des sérums de contrôle positifs et négatifs sont fournis avec le kit afin de pouvoir valider les résultats du test.



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) et embouts à usage unique
- Lecteur de microplaque (filtre 450 nm)
- Laveur de microplaques
- Incubateur à 37 ± 2 °C
- Matériel de laboratoire standard : cylindre gradué, portoir, couvercle, ...

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 trousses.
- 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.
- Le tampon de dilution est prêt à l'emploi. Le tampon de dilution est coloré en jaune. Il est utilisé pour la dilution des échantillons, des sérums positif et négatif et du conjugué.
- Le conjugué est à diluer 50 fois dans le tampon 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.

F. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à 21 ± 3 °C avant utilisation.
- Lire attentivement les points précédents.

1. Distribuer la solution de dilution 1X à raison de 50 µL par puits. Ajouter les échantillons de sérums, le sérum positif et le sérum négatif à raison de 50 µL par puits. Homogénéiser par aspiration/refoulement.

N.B. : Pour éviter les différences de temps d'incubation entre échantillons, il est possible de préparer les dilutions des échantillons, les dilutions des sérums positif et négatif dans une microplaque de dilution avant leur transfert (100 µL) dans la microplaque test à l'aide d'une pipette multicanaux.

2. Couvrir et incuber la plaque à 37 ± 2 °C pendant 120 ± 5 min.
3. 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 et le dessèchement de la microplaque entre chaque lavage.
4. Ajouter 100 µL de conjugué dilué par puits. Couvrir avec un couvercle et incuber la plaque à 37 ± 2 °C pendant 30 ± 2 min.
5. 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 et le dessèchement de la microplaque entre chaque lavage.
6. Distribuer 100 µL de la solution de TMB par puits.
7. Incuber à 21 ± 3 °C pendant 10 ± 1 min à l'abri de la lumière, sans couvrir.
8. Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µL par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
9. 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.

G. Validation des résultats

Le test ne peut être validé que si :

- la différence entre les lectures de densité optique du sérum positif et du sérum négatif est supérieure à 0,700.

$$DO_{\text{sérum négatif}} - DO_{\text{sérum positif}} > 0,700$$

- le pourcentage d'inhibition (%inh) du sérum positif est supérieur à 50%.

$$\%inh_{\text{sérum positif}} > 50\%$$

H. Interprétation des résultats

Calculer pour chaque échantillon son pourcentage d'inhibition (%inh) au moyen de la formule suivante :

$$\% inh = \frac{DO_{\text{sérum négatif}} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{sérum négatif}}} * 100$$

Echantillon	Résultats	Statut
	%inh < 40%	Négatif
	%inh ≥ 40 %	Positif

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>



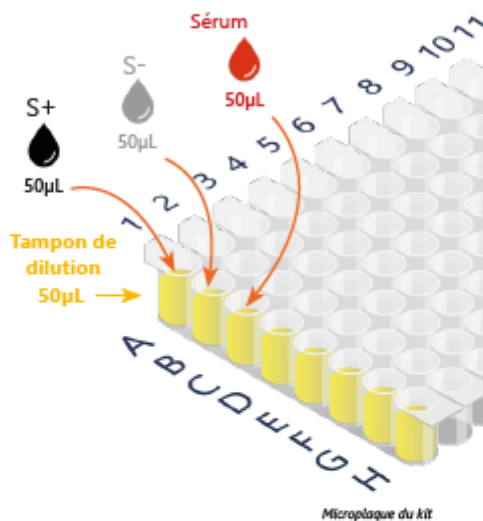
AnalysiScreen™ est le nouveau module de lecture et d'interprétation de tous les types de plaques ELISA Monoscreen™ et Multiscreen™. AnalysiScreen™ est :

- 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 Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

50 µL de tampon de dilution 1X + 50 µL de sérum
 50 µL de tampon de dilution 1X + 50 µL de sérum positif
 50 µL de tampon de dilution 1X + 50 µL de sérum négatif



Ajouter 100 µL de conjugué dilué (dilution 1/50)



Ajouter 100 µL de TMB



Ajouter 50 µL de solution d'arrêt

Enregistrer les densités optiques

