

Monoscreen AbELISA Coxiella blocking phase I

Référence : BIO K 001

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de la fièvre Q

Monocupule, test de blocage

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon / dilution	Bovin	Caprin	Ovin
Sérum / 2X	✓	✓	✓
Lait / 2X	✓	✓	✗

Présentation

Référence produit	BIO K 001/2
Format	2 plaques, barrette de 8 puits
Réactions	192 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 001/2
Microplate	Microplaque	2
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (1X)	1 X 100 mL
Conjugate	Conjugué (1X)	1 X 25 mL
CTL POS	Contrôle positif	1 X 0,5 mL
CTL NEG	Contrôle négatif	1 X 0,5 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
28/03/2023	V01	Première version
23/05/23	V02	Ajout des laits caprins, spécificité de l'anticorps

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

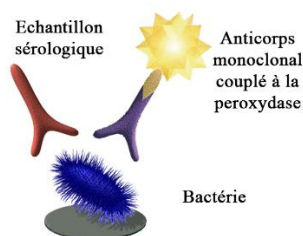
A. Introduction

La fièvre Q affecte surtout l'homme, le bétail, les moutons et les chèvres. L'agent étiologique, *Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire Gram négatif qui se multiplie dans les phagolysosomes des macrophages. *Coxiella burnetii* peut se présenter sous deux formes antigéniques : une phase I pathogène, isolée d'animaux ou d'individus infectés et une phase II avirulente, obtenue *in ovo* ou *in vitro*. Il existe 2 formes d'infection, aiguë et chronique, qui ont des profils sérologiques différents : pendant la phase aiguë de la maladie, des titres d'anticorps de type IgG sont élevés contre la phase II, tandis que pendant la phase chronique de la maladie, des niveaux élevés d'anticorps de type IgG anti-phase I et II sont observés. Chez les vaches, les brebis et les chèvres, la fièvre Q a surtout été associée à des avortements tardifs et à des troubles de la reproduction comme les naissances prématurées, les fœtus morts ou affaiblis, les métrites et l'infertilité. Néanmoins, chez une espèce donnée les réponses sérologiques ou l'isolement de la bactérie ne sont pas nécessairement en corrélation avec l'expression de la maladie clinique. Les analyses sérologiques sont appropriées pour le criblage des troupeaux, mais l'interprétation au niveau individuel peut être difficile.

B. Principe du test

L'entièreté des microplaques à 96 puits a été sensibilisée par des extraits antigéniques de *Coxiella burnetii* en phase I. Dans chaque puits, dépôt de 50 µL de solution de dilution puis de 50 µL de sérum ou de contrôles. Après 120 minutes d'incubation et une étape de rinçage, l'opérateur ajoute le conjugué, qui est un anticorps monoclonal spécifique du virénone de *Coxiella burnetii* phase 1 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 contrôles positif et négatif 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 et réservoirs à réactifs.
- Lecteur de microplaque (filtre 450nm).
- 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 manière à ce que tous les cristaux disparaissent ; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire.
- La **solution de dilution** est prête à l'emploi. La solution de dilution est colorée en jaune. Elle est utilisée pour la dilution des échantillons, des contrôles positif et négatif.
- Le **conjugué** 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 de **sérum** et les contrôles du kit (contrôle positif et négatif) doivent être dilués **2 fois** dans la solution de dilution et homogénéisés. Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou coagulés.

Dilution recommandée :

50 µL d'échantillon + 50 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 sont à diluer **2 fois** dans la solution de 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**, de **lait** et les **contrôles du kit dilués** à raison de **100 µL par puits**. Couvrir et incuber la plaque à **37 ± 2°C** pendant **120 ± 5 min**.

N.B. : Pour éviter les différences de temps d'incubation entre échantillons, il est possible de préparer les dilutions des échantillons, celles des contrôles 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. Eliminer 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.
3. Ajouter **100 µL de conjugué** par puits. Couvrir avec un couvercle et incuber la plaque à **37 ± 2°C** pendant **30 ± 2 min**.
4. Eliminer 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.
5. 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.
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 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) du contrôle positif et du contrôle négatif est supérieure à 0,600.

$$DO_{\text{contrôle négatif}} - DO_{\text{contrôle positif}} > 0,600$$

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

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

I. Interprétation des résultats

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

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

	Résultats	Statut
Echantillon	%inh < 70%	Négatif
	%inh ≥ 70 %	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>



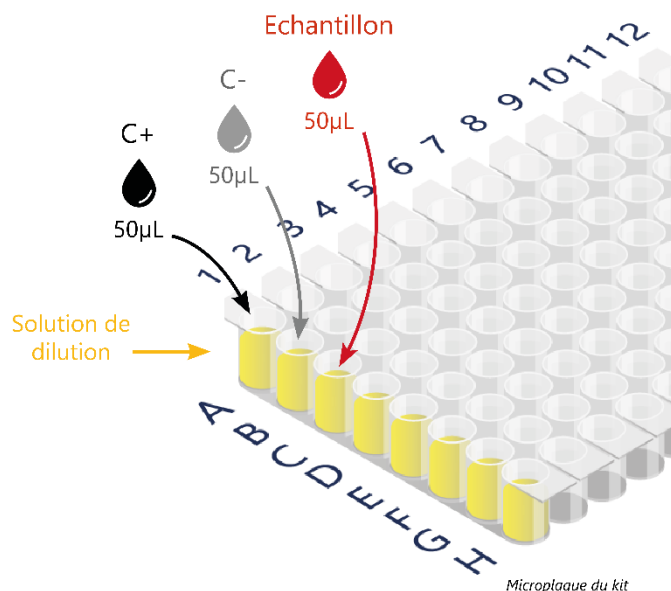
AnalysiScreen™ est le nouveau module de lecture et d'interprétation de tous les types de plaques ELISA Monoscreen™ et Multiscreen™. AnalysiScreen™ est :

- 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

- 1 Distribuer 50µL de solution de dilution
+
Ajouter 50µL des échantillons et 50µL des contrôles



- 2 Ajouter 100 µL de conjugué

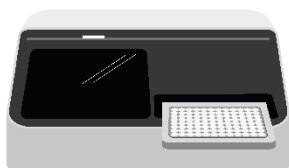


- 3 Ajouter 100 µL de TMB



- 4 Ajouter 50 µL de solution d'arrêt

- 5 Enregistrer les densités optiques



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