

MANUEL D'UTILISATION

BioLisa[®] kit Neospora Ab

Kit ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *Neospora caninum*
dans les échantillons de sérum individuel de ruminants



Méthode	Matrice	Espèce	Protocole
ELISA indirect	Sérum individuel	Bovin Ovin Caprin	Incubation courte

Information: les modifications apportées à ce document par rapport à la version précédente sont signalées par un surlignage jaune.

Cat.No. : BIOLK005
BIOLK006

MU/NEO/003/FR
Rev 06/20

biosellal

27 chemin des Peupliers
69570 Dardilly
FRANCE
+33 (0) 4 26 78 47 60
www.biosellal.com
contact@biosellal.com

Réservé à l'usage vétérinaire



• INFORMATIONS GÉNÉRALES

Neospora caninum est l'une des principale cause d'avortement et de morbidité néonatale chez les bovins, mais également chez d'autres ruminants tels que les ovins et caprins. Ce parasite répandu à travers le monde peut se transmettre de manière horizontale, mais également au cours de la gestation par sa capacité à traverser la barrière transplacentaire. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement ni vaccination efficaces pour lutter contre cette maladie. On trouve le parasite chez ses hôtes intermédiaires, sous 2 formes principales : tachyzoïtes et bradyzoïtes. De nombreux animaux dont les mammifères domestiques tels que le chien peuvent jouer ce rôle d'hôte et participer ainsi à la diffusion du parasite.

BioLisa® kit Neospora Ab est un test ELISA indirect sensible et spécifique pour la détection d'anticorps dirigés contre *Neospora caninum*, dans les échantillons de sérum individuel, chez les bovins, ovins et caprins.

• PRINCIPE DU TEST

Les échantillons sont déposés dans la plaque sensibilisée avec une préparation de tachyzoïtes de *Neospora caninum*. Les anticorps anti-*Neospora* éventuellement présents dans les échantillons se lient à l'antigène. Après une étape de lavage permettant d'éliminer les protéines non fixées, un conjugué marqué HRP est ajouté, et vient se lier spécifiquement aux anticorps de ruminants. L'excès de conjugué est éliminé par lavage, et le substrat est ajouté. Celui-ci réagit au contact de l'enzyme HRP qui se traduit par l'apparition d'une couleur bleue. Après l'ajout de la solution stop, la coloration devient jaune.

La densité optique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Une coloration jaune indique un échantillon positif.

• CONTENU DU KIT

Composant		Quantité	
		Cat.No BIOLK005	Cat.No BIOLK006
1	Test plate (Plaque de test) plaque de 12 barrettes sécables de 8 cupules	1	2
2	Diluant échantillon	1 x 30mL	1 x 60mL
3	Contrôle négatif	1 x 0.12mL	1 x 0.24mL
4	Contrôle positif	1 x 0.12mL	1 x 0.24mL
5	Solution de lavage 10X	1 x 125mL	1 x 125mL
6	Conjugué 100X	1 x 0.15mL	1 x 0.3mL
7	Diluant conjugué	1 x 15mL	1 x 30mL
8	Substrat	1 x 15mL	1 x 30mL
9	Solution stop	1 x 15mL	1 x 30mL
Certificat d'analyse			
Adhésifs de plaques			

Les composants doivent être conservés à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Conserver les barrettes des plaques entamées dans le sachet en aluminium fermé avec un dessiccant à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Les barrettes peuvent être conservées pendant 6 semaines maximum après ouverture du sachet.

• SYMBOLES

-  Fabricant
-  Numéro de lot
-  A utiliser avant le
-  Limites de température pour le stockage
-  Numéro de référence
-  Conserver à l'abri de la lumière
-  Pour les échantillons de bovins, ovins, caprins

• MATERIEL NON FOURNI

- Pipettes monocanale et multicanaux
- Réservoirs à usage unique
- Embouts de pipettes à usage unique
- Lecteur d'absorbance pour microplaques équipé d'un filtre 450nm
- Plaques de prédilution
- Eau distillée ou déionisée

• PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter un équipement de protection adéquat. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées (disponibles sur demande).

- Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement
- Manipuler le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire
- Traiter tous les réactifs et les échantillons comme des matériaux potentiellement contaminés
- L'élimination des déchets doit être réalisée dans le respect des exigences réglementaires
- Ne pas utiliser les composants après leur date de péremption
- Ne pas mélanger les composants avec ceux d'autres lots
- Inclure les contrôles positifs et négatifs lors de chaque essai réalisé

• AVANT DE COMMENCER

Porter les réactifs à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$) avant utilisation.

Solution de lavage : diluer la solution de lavage 10X au 1/10 dans de l'eau distillée/déionisée. *Exemple : pour une plaque, diluer 50mL de solution de lavage dans 450mL d'eau.*

La solution de lavage reconstituée peut être conservée un mois à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Conjugué : diluer le conjugué 100X au 1/100 dans le diluant conjugué. *Exemple : pour une plaque, diluer 100 μL de conjugué 100X dans 10mL de diluant.*

La solution de conjugué dilué doit être utilisée dans la journée.

Echantillons : des échantillons de sérum frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

• PROTOCOLE

1. Pré-dilution des échantillons au 1/20 :

Dans une plaque de prédilution, distribuer 95 μL de diluant échantillon dans chaque puits.

Distribuer 5 μL de contrôle positif (CP) et contrôle négatif (CN) dans les puits appropriés (*A1B1 et C1D1 par exemple*).

Distribuer 5 μL d'échantillon dans les puits suivants.

Agiter doucement.

2. Distribution des échantillons (dilution finale au 1/200) :

Dans la plaque de test, distribuer 10 μL d'échantillon de sérums et de contrôles prédilués au 1/20 dans les puits.

Ajouter 90 μL de Diluant échantillon dans chaque puits.

Agiter doucement et couvrir la plaque.

Incuber **1h $\pm 6\text{min}$ à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$)**.

3. Lavage :

Vider les puits et **laver 3 fois avec 300 μL** de solution de lavage diluée. Lors du dernier lavage, vider la plaque et tapoter sur du papier absorbant afin d'éliminer toute trace de liquide.

Cette étape peut être réalisée manuellement ou à l'aide d'un automate de lavage.

4. Conjugué

Distribuer 100 μL de conjugué dilué dans chaque puits.

Couvrir la plaque et incuber **1h $\pm 6\text{min}$ à $37\pm 3^{\circ}\text{C}$** .

5. Lavage :

Répéter l'étape **3. Lavage**

6. Révélation :

Distribuer 100 μL de substrat dans chaque puits.

Incuber la plaque **10 ± 1 min à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$) à l'obscurité**.

7. Arrêt de la réaction :

Arrêter la réaction en ajoutant 100µL de solution stop dans chaque puits en suivant le même ordre que lors de la distribution du substrat.

8. Lecture :

Mesurer la densité optique (DO) à l'aide d'un lecteur de plaques à **450nm** dans les 20 minutes suivant l'arrêt de la réaction. S'assurer de l'absence de poussières et de bulles dans les puits.

• CRITÈRES DE VALIDATION

Les résultats sont valides si les critères suivants sont remplis :

- Le ratio (moyenne DO CP / moyenne DO CN) doit être > 3
- La valeur moyenne des DO du contrôle positif doit être > 0.6.

Si l'un de ces critères n'est pas rempli, recommencer le test.

• CALCULS

Calculer les valeurs moyennes des DO mesurées pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

Le **pourcentage de positivité S/P** est calculé pour chaque échantillon selon la formule suivante :

$$S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}} - \text{Moyenne DO}_{\text{CN}}}{\text{Moyenne DO}_{\text{CP}} - \text{Moyenne DO}_{\text{CN}}} \times 100$$

• INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
S/P < 25	Négatif
S/P ≥ 25	Positif