

MANUEL D'UTILISATION

BioLisa[®] kit *Besnoitia* Ab

Kit ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *Besnoitia besnoiti*
dans les échantillons de sérum individuel de bovin



Méthode	Matrice	Espèce	Protocole
ELISA indirect monocupule	Sérum individuel	Bovin	Incubation courte

Cat.No. : BIOLK007
BIOLK008
BIOLK009

MU/BES/00002/FR
Rev 10/20

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

Besnoitia besnoiti est un parasite intracellulaire responsable de la besnoitiose bovine. Il s'agit d'une maladie à évolution lente, composée de plusieurs phases. Les premiers signes cliniques sont un état fébrile (fièvre, essoufflement, etc...), suivis par des oedèmes sous cutanés douloureux, et se terminant par une sclérodermie aboutissant à un taux de mortalité élevé.

Le parasite se transmet principalement par la piqure d'un vecteur, le stomox.

Aucun traitement efficace n'est connu à l'heure actuelle, et le meilleur moyen de lutte reste la prévention et le dépistage régulier des animaux infestés.

BioLisa® kit Besnoitia Ab est un test ELISA indirect monocupule sensible et spécifique pour la détection d'anticorps dirigés contre *Besnoitia besnoiti*, dans les échantillons de sérum individuel de bovin.

• PRINCIPE DU TEST

Les échantillons sont déposés dans la plaque sensibilisée avec une préparation de tachyzoïtes de *Besnoitia besnoiti*. Les anticorps anti-*Besnoitia* 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 bovins. L'excès de conjugué est éliminé par lavage, et le substrat est ajouté. Celui-ci réagit au contact de l'enzyme HRP ce 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 BIOLK007	Cat.No BIOLK008	Cat.No BIOLK009
1	Test plate (Plaque de test) plaque de 12 barrettes sécables de 8 cupules	1	2	5
2	Diluant échantillon	1 x 30mL	1 x 60mL	2 x 80mL
3	Contrôle négatif	1 x 0.12mL	1 x 0.25mL	1 x 0.6mL
4	Contrôle positif	1 x 0.12mL	1 x 0.25mL	1 x 0.6mL
5	Solution de lavage 10X	1 x 125mL	1 x 125mL	2 x 125mL
6	Conjugué 100X	1 x 0.15mL	1 x 0.3mL	1 x 0.6mL
7	Diluant conjugué	1 x 15mL	1 x 30mL	1 x 60mL
8	Substrat	1 x 15mL	1 x 30mL	1 x 60mL
9	Solution stop	1 x 15mL	1 x 30mL	1 x 60mL
Certificat d'analyse				
Adhésifs de plaques				

Les composants doivent être conservés à 5±3°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±3°C pendant une durée maximale de 6 semaines.

• 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

• MATERIEL NON FOURNI

- Pipettes monocanales et multicanaux
- Embouts de pipettes à usage unique
- Réservoirs à usage unique
- Lecteur d'absorbance pour microplaques équipé d'un filtre 450nm
- 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 ($21.5 \pm 3.5^\circ\text{C}$) 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 100µL 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. Dilution des échantillons au 1/20 :

Dans la **plaque de test**, distribuer 95µL de diluant échantillon dans chaque puits. Distribuer 5µL de contrôle positif (CP) et contrôle négatif (CN) dans les puits appropriés (*A1B1 et C1D1 par exemple*). Distribuer 5µL d'échantillon dans les puits suivants.

Agiter doucement et couvrir la plaque.

Incuber **2h $\pm$ 12min à $37 \pm 3^\circ\text{C}$.**

2. Lavage :

Vider les puits et **laver 3 fois avec 300µL** 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.

3. Conjugué

Distribuer 100µL de conjugué dilué dans chaque puits.

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

4. Lavage :

Répéter l'étape 3.

5. Révélation :

Distribuer 100µL de substrat dans chaque puits.

Incuber la plaque **10 $\pm$ 1 min à température ambiante ($21.5 \pm 3.5^\circ\text{C}$) à l'obscurité.**

6. 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.

7. 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 > 2.
- 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 < 30 %	Négatif
S/P ≥ 30 %	Positif