



Manufacturer:
DELPHARM BIOTECH
2, rue Alexander Fleming
CS 30612
69366 Lyon, Cedex 07
France

Distributeur:
Biosellal SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
France

bioScreen Ileitis Anticorps ELISA

KIT POUR LA DETECTION D'ANTICORPS
SPECIFIQUES CONTRE *Lawsonia intracellularis*
DANS LE SERUM ET PLASMA PORCIN.

TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE COMPETITION
192 réactions monocapules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit Bioscreen Ileitis Anticorps ELISA utilise une technique immuno-enzymatique permettant la détection des anticorps anti-*Lawsonia intracellularis* dans les échantillons de sérum et de plasma de porc. La réaction est composée de trois étapes :

1. Chaque échantillon de sérum ou de plasma est placé dans un puits sensibilisé avec l'antigène *Lawsonia intracellularis*. Les anticorps présents dans l'échantillon se lient à l'antigène bactérien présent au fond du puits.

2. Après une étape de lavage, l'anticorps monoclonal (Mab) anti-*Lawsonia* conjugué à la peroxydase est ajouté. Cet anticorps monoclonal qui se lie à un épitope spécifique de *Lawsonia intracellularis* se fixe sur les sites antigéniques libres formant un complexe : (Ag)-(anti-protéine Mab / peroxydase)

3. L'excès de conjugué est éliminé par une deuxième étape de lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée par l'addition d'un substrat qui se transforme en produit coloré. Les densités optiques correspondantes sont lues :

- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, une réaction colorée intense est observée en raison de la réaction du conjugué qui est lié à l'antigène libre fixé sur le support solide.

En présence des anticorps anti-*Lawsonia intracellularis* dans l'échantillon, le conjugué est moins lié à des sites antigéniques sur le support solide et donc la réaction colorée est diminuée.

II. COMPOSITION DU KIT ET CONSERVATION

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
2 microplaques contenant 12 barrettes de 8 puits sensibilisés avec <i>Lawsonia intracellularis</i>	Utilisable jusqu'à 4 semaines après l'ouverture du sachet qui doit être fermé après utilisation.
Conjugué: <i>L. intracellularis</i> Mab spécifique - peroxydase (CJ) (100 X concentré)	Diluer 100 fois dans le diluant pour conjugué. Utilisable jusqu'à 2h après dilution.
Substrat tamponné à la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi
Contrôle Négatif (NC)	Diluer comme les échantillons
Contrôle Positif (PC)	Diluer comme les échantillons
Diluant pour échantillon (SD)	Prêt à l'emploi
Solution de rinçage (W) (10X concentrée)	Diluer 10 fois dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Utilisable jusqu'à 48h après dilution.
Diluant pour conjugué (CD)	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt (S) Attention caustique!	Prêt à l'emploi
Films Adhésifs	6 films

Note : Conserver les réactifs dilués à +5 ±3°C et les utiliser comme décrit ci-dessus.

Reference: ASIL1.NA version n°3 – 12/03/2013
Les dernières modifications sont en italique.

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES (non fourni)

- Eau distillée ou déminéralisée
- Pipettes réglables ou set de pipettes, pour mesurer et délivrer de 10 à 1000µL. Les écarts de mesure doivent être inférieur à 5% pour chaque volume distribué.
- Epprouvettes graduées (100 ml and 1000 ml).
- Dispositif de lavage manuel, automatique ou semi-automatique pour microplaques.
- Lecteur de microplaques équipé de filtres pour lecture bichromatique à 450 et 630 nm. Il est également possible d'utiliser un lecteur monochromatique équipé d'un filtre de 450 nm
- Incubateur (+37 ± 3°C)

IV. PRECAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend du respect des bonnes pratiques de laboratoire et de la procédure (voir paragraphe VI).

1. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portants différents numéros de lots.
2. Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
3. Placer les réactifs à température ambiante au moins 1 heure avant utilisation. Attention : Seuls les réactifs étant utilisés dans l'étape suivante sont concernés.
4. Manipuler tous les réactifs et échantillons comme des produits à risques.
5. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. Si un contact se produit, rincez immédiatement les zones touchées avec de l'eau froide.
6. Ne jamais pipeter à la bouche.
7. Eviter les contaminations inter-échantillons lors de la collecte de l'échantillon, le stockage ou le transport. Utiliser des embouts jetables de pipette pour chaque échantillon.
8. Eviter la contamination de la solution de substrat par des ions métalliques, les agents oxydants ou des détergents. Assurez-vous que tous les contenants sont propres. Ne pas utiliser le même récipient ou le même embout de pipette pour le conjugué et le substrat.
9. Il est recommandé d'éliminer les réactifs et le matériel contaminé selon les règlements applicables. Les fiches de données de sécurité du produit sont disponibles sur demande.

Risques et sécurité :

R23/25: Toxique par inhalation et par ingestion.

R35: Provoque de graves brûlures.

R36/37/38: Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.

R41: Risque de lésions oculaires graves.

R42/43: Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau.

S7: Conserver le récipient bien fermé.

S24: Eviter le contact avec la peau.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S30: Ne jamais ajouter de l'eau au produit.

S45: En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

V. ECHANTILLONS

La réaction est effectuée sur du sérum individuel et du plasma dilué au 1/10. Les échantillons doivent être conservés comme ci-dessous :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congelé (- 20°C)	Température ambiante (+20°C)
Sérum individuel et plasma	Max. 7 jours	Oui	Non

VI. PROCEDURE

Se conformer strictement à la procédure indiquée ci-dessous. Utilisez les contrôles négatif et positif en double pour chaque plaque ou plaque partiellement utilisée.

A. ETAPES PRELIMINAIRES

1. Mettre soigneusement en place la distribution et l'identification des contrôles et des échantillons.
2. Préparer les échantillons et les contrôles à tester.

Pour les échantillons individuels:

Préparer au moins 100µL d'échantillon dilué au 1:10 dans le diluant pour échantillons.

Pour les contrôles:

Après agitation des flacons, préparer au moins 200 µL de chaque contrôle dilué au 1:10 dans le diluant pour échantillons.

B. PROTOCOLE

I - DISTRIBUTION DES ECHANTILLONS ET CONTRÔLES

1. DISTRIBUTION DES CONTRÔLES

Distribuer 100µL de contrôle négatif préalablement dilué (NC) dans les puits A1 et A2 et le contrôle positif (PC) dans les puits A3 et A4. Pour une dilution directe dans le puits, mettre 90µL de diluant pour échantillon et 10µL de contrôle.

2. DISTRIBUTION DES ECHANTILLONS

Distribuer 100µL d'échantillon préalablement dilués par puits. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Pour une dilution directe dans le puits, mettre 90µL de diluant pour échantillons et 10µL de plasma ou de sérum.

- Les barrettes doivent toujours être placées sur un portoir de sorte que le laveur et le lecteur puissent être utilisés.

- Couvrir les puits avec un adhésif, couper la longueur nécessaire pour le nombre de barrettes utilisées.

- Mélanger en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

3. Incubation de la plaque:

- Protocole d'incubation: 1 heure (± 5 min) à +37 ± 3°C.

Lavage:

Tampon de lavage: diluer la solution concentrée de lavage (W) au 1/10 dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Retirez délicatement le film adhésif, vider les puits et laver 3 fois. Un lavage suffisant et homogène de la plaque est crucial pour permettre des résultats valides. L'utilisation d'un laveur de plaques automatique est fortement recommandée. La pression de lavage utilisée ne doit pas dépasser 0.2 bar.

II - ADDITION DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué:

Diluer le conjugué concentré (CJ) au 1:100 dans le diluant de conjugué (CD). 1 ml est nécessaire pour une barrette, ce qui correspond à 10µL de CJ dans 990µL de CD.

2. Distribution du conjugué:

Ajouter 100µL de conjugué dilué dans tous les puits et couvrir avec un nouvel adhésif.

3. Incubation du conjugué:

Incuber 1 heure (± 5 min) à +37 ± 3°C.

LAVAGE :

Retirer délicatement le film adhésif, vider les puits et laver 3 fois comme décrit ci-dessus.

III - REVELATION

1. Addition du substrat :

Ajouter 100µL de substrat (PS) par puits. Ne pas couvrir avec un adhésif à ce stade. Mélanger en tapotant légèrement la plaque à la main ou utiliser un agitateur de plaque pour assurer une homogénéisation correcte.

2. Incubation du substrat :

10 ± 2 min à température ambiante (20 ± 5 ° C), à l'abri de la lumière.

3. Ajout de la solution d'arrêt:

Ajouter 50 µl de solution d'arrêt (S) par puits.

Mélanger en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque. Assurez-vous qu'il n'y est aucune bulle dans les puits.

4. Mesure de la densité optique:

Mesurer la densité optique (DO) en bichromatisme à 450 et 630 nm ou monochromatisme à 450 nm (dans la bande jaune).

La lecture en bichromatisme est recommandée. Si un lecteur monochromatique est utilisé, assurer la propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque test sont valides si :

- La DO des contrôles négatifs (NC) est ≥ 0.500 , et,
- Les pourcentages d'inhibition (valeur de PI) des témoins positifs (PC) sont $\geq 40\%$.

Ce pourcentage est calculé avec la formule suivante :

$$PI = (\overline{DO} NC - DO PC) / (\overline{DO} NC) \times 100$$

DO = moyenne des densités optiques d'un échantillon ou contrôle individuel

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

CALCUL DU POURCENTAGE D'INHIBITION (PI)

Pour chaque échantillon

$$PI = (\overline{DO} NC - DO \text{ Echantillon}) / (\overline{DO} NC) \times 100$$

DO = moyenne des densités optiques, si le test est effectué en duplicat.

- Tous les échantillons de sérum ou de plasma présentant un pourcentage d'inhibition (PI) $\geq 30\%$ sont considérés comme positifs.
- Tous les échantillons de sérum ou de plasma présentant un pourcentage d'inhibition (PI) $< 30\%$ sont considérés comme négatifs.

Dans la gamme négative des résultats, tout échantillon présentant un PI compris entre 20 et 30 doit être considéré comme douteux. Un deuxième essai sur un échantillon différent provenant du même animal est recommandé.

Interprétation des résultats

	PI 20	PI 30	
Sérum ou plasma	-	-	+
		Gamme douteuse	PI - valeur

bioScreen
European Veterinary Disease
Management Center GmbH
Bemeroder Str. 31
D- 30559 Hannover
Germany

Distribué par BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
France
+33 (0) 4 26 78 47 60
Support technique
+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

FOR VETERINARY USE ONLY /
FOR IN VITRO USE ONLY