

SVANOVIR® *Neospora*-Ab

***Neospora caninum* iscom (ELISA)**
Test d'anticorps

Contenu	N° d'article 10-2950-02
Microplaque / Microtitre plate) Microplaques (96puits) sensibilisées avec l'antigène non infectieux de <i>Neospora</i> (scellées et gardées au sec)	2 (Barrettes) 12 x 8
Conjugué / Conjugate Lyophilisé (anticorps monoclonal Ig-G de bovin conjugué à la peroxydase)	2
Solution de PBS-Tween / PBS-Tween Solution Concentrée 20 x	1 x 125 mL
Solution de substrat / Substrate Solution (TMB contenant de l'H ₂ O ₂) - CONSERVER A L'OBSCURITE	1 x 20 mL
Solution d'arrêt / Stop Solution Contient de l'acide sulfurique (2M) -CORROSIF	1 x 10 mL
A. Sérum contrôle positif / Positive Control Serum - Contiens des conservateurs	1 x 0.1 mL
B. Sérum contrôle négatif / Negative Control Serum - Contiens des conservateurs	1 x 0.1 mL

Cette notice concerne les troussees
 SVANOVIR® *Neospora*-Ab ELISA kit:
 Article number 10-950-02

Neospora caninum iscom (ELISA)

Test d'anticorps

Nom et application

SVANOVIR® *Neospora*- est un kit immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *Neospora* dans le sérum, le plasma et le lait bovin.

Informations générales

Neospora caninum est un protozoaire parasite apicomplexe, qui a été décrit pour la première fois chez les chiens souffrant d'une maladie neurologique. L'infection à *N. caninum* est reconnue comme étant une cause majeure d'avortement et de mortinatalité bovine dans le monde entier. Le parasite est transmis par voie transplacentaire à partir d'une vache infectée, à son fœtus pendant la grossesse. Cela se traduit par l'avortement, la naissance d'un veau faible ou à la naissance d'un veau cliniquement en bonne santé mais infecté de façon persistante. Le mécanisme par lequel le parasite est transmis de la mère au fœtus est inconnu ainsi que les facteurs qui déterminent le résultat de l'infection. La transmission transplacentaire peut se produire pendant les grossesses consécutives et les génisses congénitalement infectées peuvent ensuite transmettre le parasite à leur propre progéniture. Ainsi le parasite peut persister pendant une longue période dans un troupeau infecté sans la participation d'un hôte définitif de *N. caninum*. L'avortement induit par *N. caninum* peut se produire pendant la grossesse et peut inclure la mortinatalité à temps pleins, mais les avortements à 5-7 mois de gestation sont les plus communs. L'avortement bovin causé par *N. caninum* peut montrer des épidémies mais aussi des modèles endémiques. Les données épidémiologiques indiquent que les infections d'une source externe ou ponctuelle sont le plus souvent la cause la plus probable des épidémies d'avortement. Un niveau élevé ou une augmentation du taux d'avortement annuel peuvent être les conséquences principales de la transmission transplacentaire.

Principe

La méthode du kit repose sur un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (ELISA). Dans cette méthode, les échantillons de sérums sont exposés à l'antigène *Neospora* non infecté incorporé dans des iscoms dans les puits de la barrette de microtitrage. Les anticorps *Neospora* (si présent dans l'échantillon) lient l'antigène dans les puits. Le conjugué HRP qui est ensuite ajouté forme un complexe avec ces anticorps anti-*Neospora*. L'excès non lié est éliminé par les rinçages avant l'ajout de la solution de substrat. Une couleur bleu se développe, cela est dû à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleu. La réaction est arrêtée par l'ajout de la solution d'arrêt, la couleur vire au jaune. Le résultat est lu par un spectrophotomètre pour microplaque, où la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm.

Matériels nécessaires mais non fournis Précautions

1. Micropipettes de précision
2. Embouts jetables pour micropipette
3. Eau distillée, déionisée ou de l'eau ultrapure
4. Pipetteur à canaux multiples ou laveur de microplaques
5. Récipient de 1 à 2 litres pour le PBS Tween
6. Spectrophotomètre à microplaques (filtre de 405 nm)

Information sur les échantillons

Sérum:

5µl de sérum sanguin ou de plasma sont nécessaires pour chaque puits. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables.

Lait:

50µl de lait écrémé sont nécessaires pour chaque puits d'échantillon. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Les échantillons de lait doivent être centrifugés pendant 15 minutes à 2000 x g pour enlever la couche de lipide. Sinon, laisser les échantillons de lait jusqu'à ce que la couche de graisse se forme sur le dessus de l'échantillon. Pipeter sous la couche de graisse.

Préparation des réactifs :

Tampon PBS-Tween: Diluer au 1/20 la solution concentrée de PBS-Tween dans de l'eau purifiée. Préparer 500 ml par plaque en diluant 25 ml dans 475 ml d'eau et bien mélanger.

N.B. Avant la dilution, s'assurer qu'il ne reste pas de cristaux dans le tampon. Pour dissoudre les restes de cristaux, réchauffer et bien mélanger.

Pré-dilution des contrôles et des échantillons:

Pour le test, les contrôles sérum et les échantillons doivent être pré-dilués au 1/100 dans du tampon PBS-Tween (par exemple 5µl dans 495µl de tampon PBS-Tween).

Conjugué HRP: Reconstituer le conjugué HRP lyophilisé avec 11,5 ml de tampon PBS-Tween. Ajouter soigneusement le tampon dans la bouteille. Laisser reposer la solution une minute puis la vortexer. Préparer immédiatement avant l'emploi. Le conjugué reconstitué restant peut-être stocké à -20°C et décongelé et recongelés jusqu'à 3 fois.

1. Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement.
2. Conserver la trousse et tous les réactifs entre 2 -8°C.
3. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante entre 18-25°C avant usage.
4. Manipuler tout le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
5. Ne pas mélanger les composantes ni les manuels de différents lots de trousse.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composantes de la trousse.
7. Respecter la date de péremption de la trousse.
8. Ne pas manger, boire, ni fumer là où sont manipulés les échantillons et les réactifs.
9. Changer d'embout de micropipette pour chaque échantillon.
10. Ne jamais pipeter à la bouche.
11. Inclure des contrôles de sérum négatifs et positifs sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, déionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Lors de la préparation des tampons, mesurer le volume requis.
14. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique qui est corrosif.
15. L'élimination des matériaux biologiques doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations !

Les barrettes dont l'emballage est ouvert peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines au maximum.

Le conjugué reconstitué ne doit pas être stocké au réfrigérateur.

Procédure

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante 18-25°C avant usage.
 2. En duplicat, ajouter 100 µl de Sérum contrôle positif pré-dilué (Réactif A) et de sérum contrôle négatif (Réactif B) respectivement, dans les puits sélectionnés.
- A. Echantillons de sérum**
- Ajouter 100 µl d'échantillon pré-dilué dans les puits sélectionnés. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.
- B. Echantillons de lait**
- Ajouter 50µl de tampon PBS-Tween dans chaque puits, il sera utilisé pour les échantillons de lait. Ajouter 50µl d'échantillon de lait écrémé dans les puits sélectionnés. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.
3. Couvrir la plaque/barrette et mélanger. Incuber pendant 1 heure à 37°C
 4. Laver la plaque/les barrettes 3 fois avec 300µL de tampon PBS-Tween : à chaque cycle de lavage, remplir les puits, vider la plaque, et tapoter sur du papier absorbant pour éliminer les restes de liquide.
 5. Ajouter 100 µl de conjugué HRP dans chaque puits. Couvrir la plaque/barrette et incuber pendant 1 h à 37°C.
 6. Répéter l'étape 4.
 7. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante 18-25°C. Commencer le décompte quand le premier puits est rempli.
 8. Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de la solution d'arrêt dans chaque puits et mélanger. Ajouter la solution d'arrêt dans le même ordre que la solution de substrat (étape 7).
 9. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm dans un spectrophotomètre pour microplaques. Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt afin d'éviter les fluctuations des valeurs de DO.

Calculs

Calcul des valeurs de pourcentage de positivité (PP)

Calculer les valeurs de DO moyennes pour chacun des contrôles et échantillons. Toutes les valeurs de DO pour les tests d'échantillons et du contrôle négatif (Réactif B) sont liés à la valeur de DO du contrôle positif comme ci-dessous.

$$PP = \frac{\frac{DO_{\text{Echantillons ou Contrôle négatif}}}{DO_{\text{Contrôle positif}}}}{1} \times 100$$

Interprétation des résultats

Critère de validité du test

Pour garantir la validité, les valeurs de DO des duplicats du contrôle positif ne doivent pas différer de plus de 25% de la valeur moyenne de ces duplicats. En outre, les valeurs des contrôles doivent être comprises dans les limites suivantes :

DO Contrôle positif > 0.8

DO Contrôle négatif < 0.15

Pour les tests invalides, la technique peut-être suspectée et l'essai doit être répété.

Interprétation des échantillons lait et sérum

PP	Interprétation
< 20	Négatif
≥ 20	Positif

References

1. Björkman, C., Uggla, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1497-1507.
2. Björkman, C., Holmdahl, O.J.M., Uggla, A., 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68, 251-26.
3. Dubey, J.P., 1999. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1160-1163.
4. Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269-1285.
5. Frössling, J., Lindberg, A., Björkman, C., 2006. Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev. Vet. Med.* In press
6. Jenkins, M., Baszler, T., Björkman, C., Schares, G., Williams, D., 2002. Diagnosis and sero-epidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32, 631-636.
7. McAllister, M.M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881-87.
8. Varcasìa, A., Capelli, G., Ruiu, A., Ladu, M., Scala, A., Björkman, C. (2005). Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. *Parasitol. Res.* DOI 10.1007/s00436-005-0044-4
9. Wouda, W., Moen, A.R., Schukken, Y.H., 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311-1316.

Symbols

	Article No.
	Serial (batch) No.
	Temperature limit
	Expiry date
	Corrosive
	Number of tests
	See manual
	Manufacturer
	Telephone
	Fax