

SVANOVIR® *O. ostertagi*-Ab

Ostertagia ostertagi

Test d'anticorps

Contenu	N° d'article 10-2940-02
Microplaque / Microtitre plate Microplaque (96 puits) sensibilisée avec l'antigène non infectieux d' <i>O. ostertagi</i> (scellée et gardée au sec)	2 (Barrettes) 12 x 8
Conjugué / Conjugate Prêt à l'emploi (anticorps monoclonal anti-IgG de bovins conjugué à la peroxydase)	1 x 24 mL
Solution PBS-Tween / PBS-Tween Solution Concentrée 20 fois	1 x 125 mL
Solution de substrat / Substrate Solution ABTS - CONSERVER A L'OBSCURITE !	1 x 50 mL
Solution stop / Stop Solution Contient 1% SDS	1 x 25 mL
A. Sérum contrôle positif / Positive Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 2.5 mL
B. Sérum contrôle négatif / Negative Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 2.5 mL

Cette notice concerne le kit
 SVANOVIR® *O. ostertagi*-Ab kit: Article
 number 10-2940-02

Ostertagia ostertagi

Test d'anticorps

Nom et application

SVANOVIR® *O. ostertagi*-Ab est un kit immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *O. ostertagi* dans les laits de tank. La détection des anticorps anti-*Ostertagia ostertagi* dans les échantillons de lait de bovin est un bon indicateur du niveau d'infection, ce qui fait de cet outil un instrument intéressant pour déterminer la nécessité d'un contrôle vermifuge.

Information générales

Ostertagia ostertagi est l'un des nematodes gastro-intestinaux les plus répandus dans le bétail à travers le monde. Le parasite a un cycle de vie comprenant deux phases différentes : la première phase en liberté dans les pâturages, et la deuxième phase comme un parasite chez l'hôte, infestant la caillette. Comme *Ostertagia ostertagi* est présent dans les pâturages, tous les bovins des régions à climat tempéré sont exposés au parasite.

Les larves de stade 1 se développent à partir des œufs dans les fèces, puis muent en larves de second stade. L'ingestion d'herbe contaminée par des larves de stade 3, qui se sont développées à partir du deuxième stade larvaire et toujours enfermées dans une gaine, conduira à l'infestation réelle. Les larves du troisième stade pénètrent dans les glandes gastriques de la caillette dans les 6 heures après l'ingestion. Le développement d'adulte du quatrième stade à lieu. Ces vers adultes vont alors émerger vers la lumière de la caillette. L'infestation de nématode dans les vaches adultes est principalement subclinique, mais peut conduire à une diminution de la production de lait. Il est important de déterminer le niveau d'infestation et la nécessité d'un traitement vermifuge.

Principe

La méthode du kit repose sur un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (ELISA). Dans cette méthode, les échantillons de laits sont exposés à l'antigène *O. ostertagi* non infectieux dans les puits de la barrette de microtitrage. Les anticorps anti-*O. ostertagi* (si présents dans l'échantillon de sérum) se lient à l'antigène dans les puits. Le conjugué HRP qui est ajouté ensuite forme un complexe avec ces anticorps anti-*O. ostertagi*. L'excès non lié est éliminé par rinçages avant l'ajout de la solution de substrat. Une couleur bleu-vert se développe qui est due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleu-vert. La réaction est arrêtée par l'ajout de la solution d'arrêt. Le résultat est lu par un spectrophotomètre pour microplaque, où la densité optique (DO) est mesurée à 405 nm.

Matériels nécessaires mais non fournis

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

Lait:

100µl de lait écrémé sont nécessaires pour chaque puits. 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 reposer 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.

Précautions

1. Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement.
2. Conserver le kit et tous les réactifs entre 2 - 8°C.
3. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante entre 18-25°C avant utilisation.
4. Manipuler tout le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
5. Ne pas mélanger les composants ni les manuels de différents lots de kits.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composants du kit.
7. Respecter la date de péremption du kit.
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 négatif et positif 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. L'élimination des matériaux biologiques doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations !

Le volume des réactifs est suffisant pour au moins 8 tests séparés.

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

Protocole

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante 18-25°C avant utilisation. Annoter chaque barrette avec un numéro.
2. Ajouter les échantillons
- A. Ajouter 100 µl de contrôle positif (Réactif A) et 100µl de contrôle négatif (Réactif B) dans les puits sélectionnés. Pour une confirmation, il est recommandé de tester les contrôles en doublons.
- B. Ajouter 100µl 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. Mélanger la plaque. Couvrir la plaque/barrette et l'incuber pendant 1h à température ambiante, 18-25°C.
4. Laver la plaque/les barrettes 3 fois avec 300µL de tampon PBS-Tween dilué : 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 température ambiante, 18-25°C.
6. Répéter l'étape 4.
7. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 30 minutes, à l'obscurité et à température ambiante 18-25°C. Commencer le décompte quand le premier puits est rempli.
8. Arrêter la réaction en ajoutant 50µl de la solution stop dans chaque puits et mélanger. Ajouter la solution stop dans le même ordre que la solution de substrat (étape 7)
9. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution stop afin d'éviter les fluctuations des valeurs de DO.

Calculs

Calculer les valeurs de DO moyenne pour les contrôles et les échantillons. Calculer les valeurs de DOR pour les contrôles ainsi que les échantillons en utilisant la formule suivante :

$$DOR = \frac{DO \text{ échantillon ou contrôle} - DO \text{ contrôle négatif}}{DO \text{ contrôle positif} - DO \text{ contrôle négatif}}$$

Interprétation des résultats

Critère de validité du test

Pour garantir la validité de l'essai, 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 <**0.4**

Pour l'interprétation des données, voir la figure 1. Dans le cas d'un test invalide, la technique peut être suspectée et l'essai doit être répété.

Interprétation

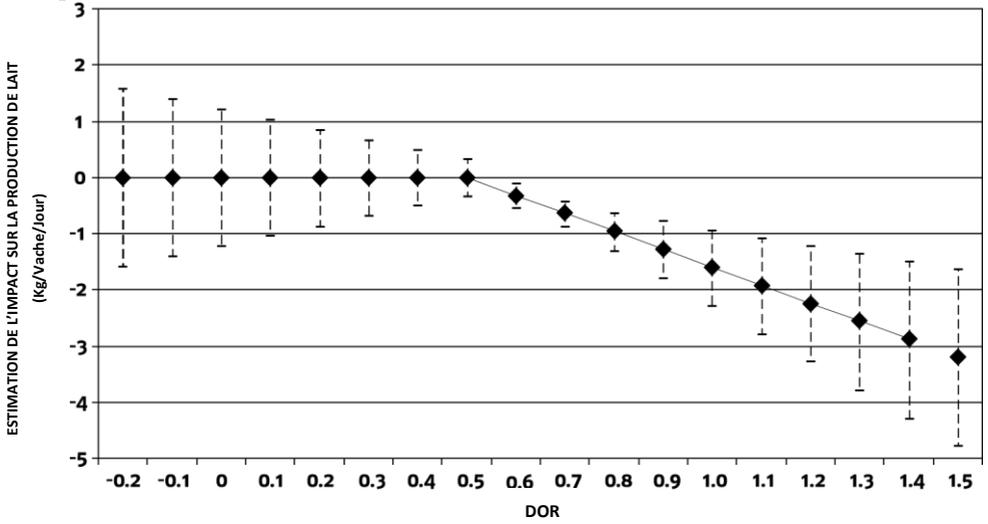


Figure 1

Pour évaluer l'importance de l'infestation par les nématodes gastro-intestinaux dans un troupeau, la valeur de DOR du lait de tank doit être reportée sur la ligne. L'effet probable de l'infestation sur le rendement laitier moyen du troupeau est lu sur l'axe Y.

References

1. Sanchez J., Dohoo I., Nødtvedt A., Keefe G., Markham F., Leslie K., DesCôteaux L., Campbell J., 2002. A longitudinal study of gastrointestinal parasites in Canadian dairy farms The value of an indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA as a monitoring tool. *Vet. Parasitol.* 107, 209-226.
2. Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Vercruyse J., 2005. Assessment of the repeatability of a milk *Ostertagia ostertagi* ELISA and effects of sample preparation. *Preventive Veterinary Medicine* 68, 277-288.
3. Charlier J., Claerebout E., Duchateau L., Vercruyse J., 2005. A survey to determine relationships between bulk tank milk antibodies against *Ostertagia ostertagi* and milk production parameters. *Veterinary Parasitology* 129, 67-75.
4. Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Vercruyse J., 2007. Predicting milk-production responses after an autumn treatment of pastured dairy herds with eprinomectin. *Veterinary Parasitology* 143, 197-390.

The test has been developed in co-operation with the Department of Virology, Parasitology and Immunology- Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

Symbols

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



Produit par SVANOVA
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