

MANUEL D'UTILISATION

BioLisa[®] kit MAP Ab

Kit ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *Mycobacterium avium paratuberculosis*



Méthode	Matrices	Espèces	Protocoles
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

biosellal

Cat.No. : BIOLK001
BIOLK002

MU/MAP/009/FR
Rev 06/20

Réservé à l'usage vétérinaire

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



• INFORMATIONS GÉNÉRALES

La paratuberculose est une maladie bactérienne entérique chronique causée par *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), pouvant toucher différentes espèces de ruminants. Elle se traduit généralement par une diarrhée, une perte de poids et un affaiblissement de l'animal de plus en plus sévères. L'excrétion fécale des Mycobactéries par les animaux infectés induit une contamination de l'environnement et une source importante de contagion au sein des troupeaux. Cette excrétion débutant avant l'apparition des premiers signes cliniques, le contrôle et le diagnostic de la maladie nécessitent un suivi régulier des troupeaux.

BioLisa® kit MAP Ab est un test ELISA sensible et spécifique pour la détection d'anticorps dirigés contre MAP, dans le sérum individuel de ruminants, avec pour les bovins, une corrélation avec l'excrétion fécale.

• PRINCIPE DU TEST

Les échantillons sont déposés dans la plaque sensibilisée avec un antigène inactivé MAP. Les anticorps anti-MAP éventuellement présents dans les échantillons se lient à l'antigène. Après une étape de lavage permettant d'éliminer les protéines non fixées, un conjugué HRP anti-bovin est ajouté. Dans le cas où des anticorps de bovin se sont fixés au fond du puits (cas d'un échantillon positif), ce conjugué se fixe spécifiquement. 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 indique la présence d'un résultat positif.

• CONTENU DU KIT

Composant		Quantité	
		Cat.No BIOLK001	Cat.No BIOLK002
1	Plaque de test (Test plate) 12 barrettes sécables de 8 cupules par plaque	2	5
2	Diluant échantillon	1 x 30mL	1 x 60mL
3	Contrôle négatif	1 x 0.5mL	1 x 1.2mL
4	Contrôle positif	1 x 0.5mL	1 x 1.2mL
5	Solution de lavage 10X	1 x 125mL	2 x 125mL
6	Conjugué 100X	1 x 0.3mL	1 x 0.6mL
7	Diluant conjugué	1 x 30mL	1 x 60mL
8	Substrat	1 x 30mL	1 x 60mL
9	Solution stop	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. Les barrettes des plaques entamées peuvent être conservées dans le sachet en aluminium fermé avec un dessiccant à 5±3°C pendant une durée maximale de 6 semaines.

• SYMBOLES



Contient des réactifs pour <N> tests



Fabricant



Numéro de lot



A utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Numéro de référence



Numéro de matériel



Conservé à l'abri de la lumière



Pour les échantillons de bovins, ovins, caprins

• MATERIEL NON FOURNI

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

• 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 100µL de conjugué 100X dans 10mL de diluant.*

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

Echantillons : des sérums individuels frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

• PROTOCOLE

1. Pré-dilution des échantillons au 1/12 :

Dans une plaque de prédilution, distribuer 10µL de contrôle positif (CP) et contrôle négatif (CN) dans les puits appropriés (*A1B1 et C1D1 par exemple*).

Distribuer 10µL d'échantillon dans les puits suivants.

Ajoutez 110µL de diluant échantillon dans chaque puits contenant des contrôles.

Agiter doucement et incuber **15±2 minutes à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$)**.

2. Distribution des échantillons :

Transférer 100µL des échantillons et contrôles prédilués dans la plaque de test.

Agiter doucement et couvrir la plaque.

Incuber **45±5 minutes à température ambiante ($21\pm 4^{\circ}\text{C}$)**.

3. Lavage :

Vider les puits et **laver 4 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.

4. Conjugué

Distribuer 100µL de conjugué dilué dans chaque puits.

Couvrir la plaque et incuber **30±3 minutes à $37\pm 3^{\circ}\text{C}$** .

5. Lavage :

Répéter l'étape 3. **Lavage**

6. Révélation :

Distribuer 100µL 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

8. Lecture :

Mesurer la densité optique (DO) à l'aide d'un lecteur de plaque à **450nm** dans les 30 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.

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

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 (CN) et le contrôle positif (CP).

Le **Pourcentage de positivité S/P** pour chaque échantillon est calculé 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

Sérums bovins

	RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
Individuel	S/P < 35%	Négatif
	35% ≤ S/P < 60%	Faible positif +
	S/P ≥ 60%	Fort positif ++

N.B. : Les deux seuils de positivité ont été établis d'après une étude terrain, en corrélation avec des valeurs prédictives positives d'excrétion fécale de l'ordre de 50% et 90% respectivement.

Sérums ovins et caprins

Pour une interprétation d'analyse sur ovins et caprins, contacter le service technique de Biosellal.