

LACTELISA[®] Brucella Ab Mono Indirect

KIT DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-BRUCELLA DANS LES ECHANTILLONS DE LAIT DE BOVIN (INDIVIDUELS ET MELANGES)

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

384 réactions monocupules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit LACTELISA[®] Brucella Ab Mono Indirect utilise une technique immuno-enzymatique indirecte, monocupule permettant la détection des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) de *Brucella*, agent de la brucellose, dans les échantillons de lait individuel ou de mélange, selon la réglementation en vigueur (**Note : En France, seul le dépistage sur lait de mélange est autorisé**).

La réaction comporte 3 étapes :

1. Chaque échantillon de lait est déposé dans une cupule sensibilisée par les LPS de *Brucella*. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène microbien.

2. Après lavage, un conjugué anticorps monoclonal (AcM) anti-IgG de bovin / peroxydase est ajouté. Il vient se fixer sur les Ig de bovin (anticorps) préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe :

(Ag) - (Ac) - (AcM anti IgG de bovin/ peroxydase).

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction enzymatique, la densité optique est mesurée. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues grâce au témoin positif.

II. COMPOSITION ET CONSERVATION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 microplaques contenant 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées avec des LPS de <i>Brucella</i>	Utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Conjugué : AcM anti-IgG de bovin/ peroxydase (CJ) (20 fois concentré)	Diluer 20 fois dans le diluant du conjugué et utiliser dans les 24 heures après dilution
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi
Témoin positif (P)	Prêt à l'emploi
Solution de lavage (W) (10 fois concentrée)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48 heures après dilution.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi
Films adhésifs	12 films

NB : Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à + 5°C ± 3°C et utilisés dans les délais indiqués ci-dessus.

III. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Eau distillée ou déminéralisée.
- Pipettes réglables, ou fixes, pour mesurer et délivrer de 0 à 1000 µl. L'erreur de la mesure doit être ≤ 10% pour des volumes ≤ 10 µl et ≤ 5% pour tous les autres volumes indiqués.
- Eprouvettes graduées de 100 ml et 1000 ml.
- Dispositif de lavage, de préférence automatique pour plaques de microtitration.
- Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres pour lecture bichromatique à 450 et 630 nm. Il est toutefois possible d'utiliser un lecteur monochromatique équipé d'un filtre à 450 nm.
- Incubateur à +37°C ± 3°C.

IV. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

La qualité des résultats dépend du respect du mode opératoire (cf. paragraphe VI) et des bonnes pratiques de laboratoire.

1. Ne pas mélanger ou associer des réactifs provenant de kits portant des numéros de lots différents
2. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.
3. Placer les réactifs à la température du laboratoire au minimum 1 heure avant utilisation.
4. Manipuler réactifs et échantillons comme des produits à risques.
5. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact accidentel, rincer abondamment à l'eau froide les parties exposées.
6. Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
7. Eviter les contaminations inter-échantillons lors du prélèvement, du stockage ou du transport. Il est nécessaire de changer d'embout de pipette pour chaque échantillon.
8. Ne pas contaminer la solution substrat par des ions métalliques, des oxydants, des détergents. Veiller à la propreté des récipients. Ne pas utiliser le même récipient ou le même embout de pipette pour le conjugué et le substrat.
9. Il est conseillé d'éliminer les réactifs et matériels en contact avec les réactifs selon les exigences réglementaires. Les fiches de sécurité du produit sont disponibles sur demande.

Phrases de risques :

R35 : Provoque de graves brûlures.

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

S30 : Ne jamais verser de l'eau dans le produit.

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

V. TRAITEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

La réaction est effectuée sur lait, individuel ou de mélange (jusqu'à 50 laits), non dilué, écrémé.

"Ecrémage total ou partiel du lait avant toute analyse"

Technique requise pour un écrémage total : centrifugation des échantillons de lait à une vitesse permettant la séparation de la matière grasse et du lactosérum

Technique requise pour un écrémage partiel : décantation des laits pendant un temps suffisant pour permettre la séparation de la matière grasse et du lactosérum

Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

Echantillons	Froid (+5°C)	Congélation (-20°C)	Température ambiante (20°C)
Laits individuels ou mélanges	max. 5 j.	Oui	Non

VI. MODE OPERATOIRE

Suivre le mode opératoire. Distribuer les témoins négatif et positif en double pour chaque série de déterminations et au minimum pour chaque plaque.

A. ETAPES PREPARATOIRES

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons.
2. Préparer les échantillons à tester. Les laits sont testés non dilués et de préférence écrémés :
 - pour les laits entiers, attendre la décantation et pipeter sous l'anneau de crème,
 - pour les laits écrémés, homogénéiser avant de pipeter.

B. REALISATION DU TEST

I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

1. Distribution des témoins :

Les témoins sont prêts à l'emploi.

Après agitation des flacons, déposer 200 µl de témoin négatif (N) dans les cupules A1 et A2. Déposer ensuite 200 µl de témoin positif (P) dans les cupules B1 et B2.

2. Distribution des échantillons :

Distribuer les échantillons de laits à tester à raison de 200µl par cupule. Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne.

Toujours disposer les barrettes sur un cadre. Celui-ci sera nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.

Recouvrir les cupules avec la longueur nécessaire de film adhésif.

Homogénéiser par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

3. Incubation de la plaque

Incuber la plaque 1 heure ± 5 min. à + 37°C ± 3°C ou 1 nuit (14-18 heures) à +5°C ± 3°C.

LAVAGE :

Solution de lavage : préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage par dilution au 1/10 de la solution concentrée W dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) au 1/20 dans le diluant du conjugué (CD) (4 ml sont nécessaires par barrette, soit 200 µl de CJ dilués dans 3,8 ml de CD).

2. Distribution du conjugué :

Distribuer 200 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules. Recouvrir avec un film adhésif neuf.

3. Incubation du conjugué :

Incuber le conjugué 1 heure ± 5 min. à + 37°C ± 3°C ou 90 min. ± 5 min. à température du laboratoire (+20°C ± 5°C).

LAVAGE :

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

III – REVELATION

1. Ajout du substrat :

Distribuer 200 µl de tampon substrat (PS) par cupule. Ne pas mettre de film adhésif lors de cette étape. Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque.

2. Incubation du substrat :

Incuber 30 min. ± 5 min. à température du laboratoire (+20°C ± 5°C) et à l'obscurité.

3. Ajout de la solution d'arrêt :

Distribuer 50 µl de solution d'arrêt (S) par cupule.

Homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque. S'assurer qu'il n'y a pas de formation de bulles dans les cupules. Essuyer soigneusement le dessous des plaques.

4. Mesure des densités optiques :

Mesurer les densités optiques (DO) en bichromatisme à 450 et 630 nm ou en monochromatisme à 450 nm (dans le jaune).

La lecture en bichromatisme est fortement recommandée.

Dans le cas d'utilisation d'un lecteur monochromatique, veillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série sont validés :

- si la densité optique DO obtenue avec le témoin positif est > à 0,300 et

- si la densité optique DO obtenue avec le témoin négatif est < à 0,25 x DO P.

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour caractériser la présence ou l'absence d'anticorps anti LPS de Brucella dans un échantillon, on compare la DO obtenue sur la cupule à des valeurs seuils. Celles-ci sont obtenues à partir de la densité optique moyenne du témoin positif.

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

Méthode 1 : CALCUL DE L'INDICE DE L'ECHANTILLON

- Indice de l'échantillon = $0,50 \times (\overline{DO} \text{ échantillon} - \overline{DO} P)$

\overline{DO} : moyenne des DO pour les échantillons testés en double.

- Calcul des valeurs seuils en indice :

pour mélanges : valeur seuil : $-0,20 \times (\overline{DO} P)$

pour individuels : valeur seuil positive : $-0,05 \times (\overline{DO} P)$

valeur seuil négative : $-0,20 \times (DO P)$

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice \geq à $-0,05 \times \overline{DO} P$ est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice $<$ à $-0,2 \times \overline{DO} P$ est considéré comme **négatif**.

Tout échantillon de lait individuel présentant un indice compris entre $-0,05 \times DO P$ et $-0,2 \times DO P$ est considéré comme **douteux**.

Tout échantillon de lait de mélange présentant un indice \geq à $-0,2 \times DO P$ est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de lait de mélange présentant un indice $<$ à $-0,2 \times DO P$ est considéré comme **négatif**.

Méthode 2 : ANALYSE DE DENSITES OPTIQUES

Calculer les valeurs seuils en DO correspondant à [$0,9 \times (\overline{DO} P)$] (seuil positif pour individuels) et [$0,6 \times (DO P)$] (seuil négatif pour individuels et positif pour mélanges). Comparer chacune des DO des échantillons à ces valeurs seuil.

Tout échantillon de lait individuel présentant une DO \geq à $0,9 \times \overline{DO} P$ est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de lait individuel présentant une DO $<$ à $0,6 \times \overline{DO} P$ est considéré comme **négatif**.

Tout échantillon de lait individuel présentant une DO compris entre $0,9 \times DO P$ et $0,6 \times DO P$ est considéré comme **douteux**.

Tout échantillon de lait de mélange présentant une DO \geq à $0,6 \times DO P$ est considéré comme **positif**.

Tout échantillon de lait de mélange présentant une DO $<$ à $0,6 \times \overline{DO} P$ est considéré comme **négatif**.

Interprétation des résultats

	0	$0,60 \times (\overline{DO} P)$	$0,90 \times (\overline{DO} P)$	
Lait individuel	-	+/-	+	DO échantillons
Mélange de laits	-	$0,60 \times (\overline{DO} P)$	+	DO échantillons

Pour toute question, nous contacter :
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming
69367 LYON Cedex 07 – France
Tel : 04.72.76.11.11 - Fax : 04.72.76.11.10
www.synbiotics.fr info@synbiotics.fr

POUR USAGE VETERINAIRE SEULEMENT /
POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT