

SYNBIOTICS EUROPE SAS
2, rue Alexander Fleming
F- 69367 Lyon, Cedex 07

SERELISA[®] Brucella OCB Ab Mono Indirect

KIT DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI
LIPOPOLYSACCHARIDES DE *Brucella*
DANS LES SERUMS BOVINS (INDIVIDUELS ET MELANGES),
OVINS ET CAPRINS (INDIVIDUELS)

TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE INDIRECTE

384 réactions monocapules

I. PRINCIPE DU TEST

Le kit « SERELISA[®] Brucella OCB Ab Mono Indirect » utilise une technique immuno-enzymatique indirecte permettant la détection dans les sérums bovins, ovins et caprins individuels et mélanges de 10 sérums bovins (selon la réglementation en vigueur) des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) de *Brucella*. La réaction comporte 3 étapes :

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

2. Après lavage, un anticorps conjugué peroxydase est ajouté. Il vient se fixer sur les immunoglobulines préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe :

(Ag LPS) - (Ac anti LPS) - (conjugué peroxydase).

3. L'excès de conjugué est éliminé par lavages. 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, les densités optiques sont mesurées. La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues en fonction du 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 peroxydase (CJ) | <u>Protocole sur sérums individuels</u> : diluer 200 fois dans le CD. <u>Protocole sur mélanges de sérums</u> : diluer 100 fois dans le CD. Utiliser dans les 2 h après dilution. |
| Tampon substrat de la peroxydase (PS) | Prêt à l'emploi |
| Témoin négatif (N) | <u>Protocole sur sérums individuels</u> : diluer 100 fois dans le SD. <u>Protocole sur mélanges de sérums</u> : diluer 200 fois dans le SD. |
| Témoin positif (P) | <u>Protocole sur sérums individuels</u> : diluer 100 fois dans le SD. <u>Protocole sur mélanges de sérums</u> : diluer 200 fois dans le SD. |
| Diluant des échantillons (SD) | 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 : Les réactifs dilués doivent être conservés à **+5°C ± 3°C** et utilisés dans les délais indiqués ci-dessus.

Référence : SBRU3OCB.NF version n2 du 24/01/2007

Version n1 → n2 : modification de la partie IV

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.
- Epruvettes 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.

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. **Attention** : seuls les réactifs utilisés dans l'étape suivante sont concernés.
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 :

R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion.

R35 : Provoque de graves brûlures.

R 36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.

R 41 : Risque de lésions oculaires graves.

R 42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau.

S 7 : Conserver le récipient bien fermé.

S 24 : 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 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 sérums individuels dilués au **1/100^{ème}** et sur mélanges de 10 sérums au maximum dilués au **1/20^{ème}**. Les échantillons peuvent être conservés comme suit :

| Echantillons | Froid (+5°C) | Congélation (-20°C) | Température ambiante (20°C) |
|---|--------------|---------------------|-----------------------------|
| Sérums individuels ou mélanges (non dilués) | max. 7 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 analyser :

Protocole sur sérums individuels **dilution 1/100^{ème}** :

A titre d'exemple : diluer les échantillons au 1/10^{ème} en tube ou dans une plaque de dilution dans le diluant des échantillons (SD). Diluer à

nouveau au 1/10^{ème} en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons (SD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges dilution 1/20^{ème} :

Préparation des mélanges : par exemple, additionner 10 µl de chacun des sérums individuels pour former un mélange de 10 échantillons de 100 µl.

Diluer les mélanges au 1/20^{ème} en tube ou directement dans la plaque à raison de 5 µl de mélange dans 95 µl de diluant des échantillons (SD).

B. REALISATION DU TEST

I - DEPOT DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

1. Distribution des témoins :

Pour les deux protocoles suivants, le témoin négatif (N) est déposé dilué dans les cupules A1 et A2, le témoin positif (P) dilué dans les cupules B1 et B2 à raison de 100 µl par puits.

Protocole sur sérums individuels dilution 1/100^{ème} :

Après agitation des flacons, diluer par exemple les témoins au 1/10^{ème} dans le diluant des échantillons (SD) en tube ou dans une plaque de dilution puis diluer à nouveau au 1/10^{ème} en tube ou directement dans la cupule à raison de 10 µl de pré-dilution dans 90 µl de diluant des échantillons (SD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges dilution 1/200^{ème} :

Après agitation des flacons, diluer les témoins au 1/10^{ème} dans le diluant des échantillons (SD) en tube ou dans une plaque de dilution puis diluer à nouveau au 1/20^{ème} en tube ou directement dans la plaque à raison de 5 µl de pré-dilution dans 95 µl de diluant des échantillons (SD).

2. Distribution des échantillons :

Voir paragraphe VI.A.2 pour la préparation des sérums et la dilution directement en cupule.

Les échantillons sont testés en simple ou en double et la distribution est effectuée en colonne. Distribuer 100 µl par puits.

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

1 h (± 5 min) à +37°C (± 3°C)

LAVAGE :

Solution de lavage : préparer la quantité suffisante par dilution de la solution de lavage concentrée (W) 10 fois en eau distillée ou déminéralisée.

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

II – AJOUT DU CONJUGUE

1. Préparation du conjugué :

Protocole sur sérums individuels dilution 1/200^{ème} :

Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) concentré **200 fois** dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 10 µl de CJ dilué dans 1,99 ml de CD).

Protocole sur sérums bovins en mélanges dilution 1/100^{ème} :

Préparer la solution de conjugué par dilution du conjugué (CJ) concentré **100 fois** dans le diluant du conjugué (CD) (2 ml sont nécessaires par barrette, soit 20 µl de CJ dilué dans 1,98 ml de CD).

2. Distribution du conjugué :

Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans toutes les cupules. Recouvrir avec un film adhésif neuf.

3. Incubation du conjugué :

Incuber le conjugué 30 minutes (± 5 min) à +37°C (± 3°C).

LAVAGE :

Oter délicatement le film adhésif et laver 4 fois.

III – REVELATION

1. Ajout du substrat :

Distribuer 100 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, veuillez attentivement à l'état de propreté du fond des cupules avant lecture.

VII. VALIDATION DU TEST

Les résultats de chaque série sont validés si :

$$\overline{DO} P \geq 0,5 \text{ et } \overline{DO} N < 0,3 * \overline{DO} P.$$

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

VIII. EXPRESSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La présence ou l'absence d'anticorps anti-LPS de *Brucella* est déterminée par la comparaison des Densités Optiques (DO) à des valeurs seuils obtenues à partir du témoin positif.

Deux méthodes de calcul et d'interprétation sont utilisables :

Méthode 1 : CALCUL DES INDICES :

La valeur seuil positive en indice = 0

Pour sérums individuels et mélanges de sérums :

$$\text{Indice échantillon} = 0,50 \times (\text{DO échantillon} - 0,6 \times \overline{DO} P)$$

Tout échantillon, ou mélange d'échantillons, présentant un indice ≥ 0 est considéré comme **positif**.

Tout échantillon, ou mélange d'échantillons, présentant un indice < 0 est considéré comme **négatif**.

Méthode 2 : ANALYSE DE DENSITES OPTIQUES

Pour sérums individuels et mélanges de sérums :

$$\text{Valeur seuil positif} \Rightarrow \alpha = 0,6 \times \overline{DO} P$$

Comparer chacune des DO des échantillons à cette valeur seuil.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une DO $\geq \alpha$ est considéré comme **positif**.

Tout échantillon ou mélange d'échantillons, présentant une DO $< \alpha$ est considéré comme **négatif**.

Interprétation des résultats

| | | | |
|------------------------|---|----------|----------------|
| | | α | |
| Individuel ou mélanges | - | | + |
| | | | DO échantillon |

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