



MODE D'EMPLOI
(usages in-vitro et vétérinaires
uniquement)

COMPELISA 160 & 400

Un kit ELISA-compétition pour la détection
des anticorps anti-Brucella dans les
échantillons de sérum

Ce kit COMPELISA a été standardisé pour être utilisé dans le cadre du dépistage de la brucellose chez les vaches, moutons et chèvres. L'APHA a également utilisé ce kit avec succès pour le dépistage de l'infection dans de nombreuses autres espèces, notamment : porcs, mammifères marins, camélidés et chiens.

Conserver le kit au réfrigérateur dès réception, à 4°C ± 3°C. Retirer le conjugué immédiatement et le stocker au congélateur à -20°C.

Pour tous renseignements concernant ce kit, prière de s'adresser à :

APHA Scientific Sales Desk
Animal and Plant Health Agency
New Haw, Addlestone, Surrey, KT15 3NB, United Kingdom
Tel: +44 (0)1932 357641, Fax: +44 (0)1932 357701
Email: salesdesk@apha.gsi.gov.uk

Ou visiter notre site Internet :

www.aphascientific.com

APHA Scientific is the commercial department of the Animal and Plant Health Agency, which is an executive agency of the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra), working across Great Britain on behalf of Defra, the Scottish Government and Welsh Government.

Sécurité

Urée H₂O₂ CAS 124-43-6

Irritant- irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau.

Acide citrique CAS 77-92-9

Irritant – irritant pour les yeux et en cas d'inhalation de la poudre.
Potentiellement allergisant. Potentiellement dangereux si ingéré en grande quantité.

Porter des équipements de protection appropriés (gants et lunettes).

OPD CAS 95-54-5

Toxique et cancérigène. Dangereux en cas d'inhalation, de contact avec la peau et d'ingestion. Irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau.
Peut être sensibilisant par inhalation et contact cutané. Porter des équipements de protection appropriés (gants et lunettes).

Contenu du kit

Merci de vérifier que le kit est complet avant de l'utiliser.

Plaques	Pré-sensibilisées avec l'antigène LPS de <i>B. melitensis</i> .
Conjugué	Flacon à conserver à -20°C
Contrôles	Sérum positif Sérum négatif
Substrat chromogène	Comprimés d'OPD (Attention : toxique !) Comprimés de Peroxyde d'hydrogène (Attention : irritant !)
Solution tampon de dilution	Comprimés de tampon phosphate salin (PBS) Rouge phénol (indicateur de pH coloré) Tween 20 (surfactant)
Solution d'arrêt	Acide citrique (Attention : irritant !)
Solution de rinçage	Comprimés de Na ₂ HPO ₄ (hydrogénophosphate bisodique)

Matériel requis

Lecteur de plaques microtitre avec filtre de 450nm

Pipettes automatiques simples et multicanaux

Embouts jetables pour lesdites pipettes

Bacs à réactifs pour le pipetage multicanal

Récipient de 10 litres pour la solution de rinçage

Réfrigérateur à 4°C ± 3°C

Agitateur rotatif, réglé sur 160 tours/min

Agitateur pour plaques microtitre

Eau distillée (ou dé-ionisée) stérile

Erlenmeyers, fioles, tubes et béciers pour le stockage des sérums et réactifs.

Papier absorbant

Congélateur pour le stockage du conjugué

Bain-marie (optionnel)

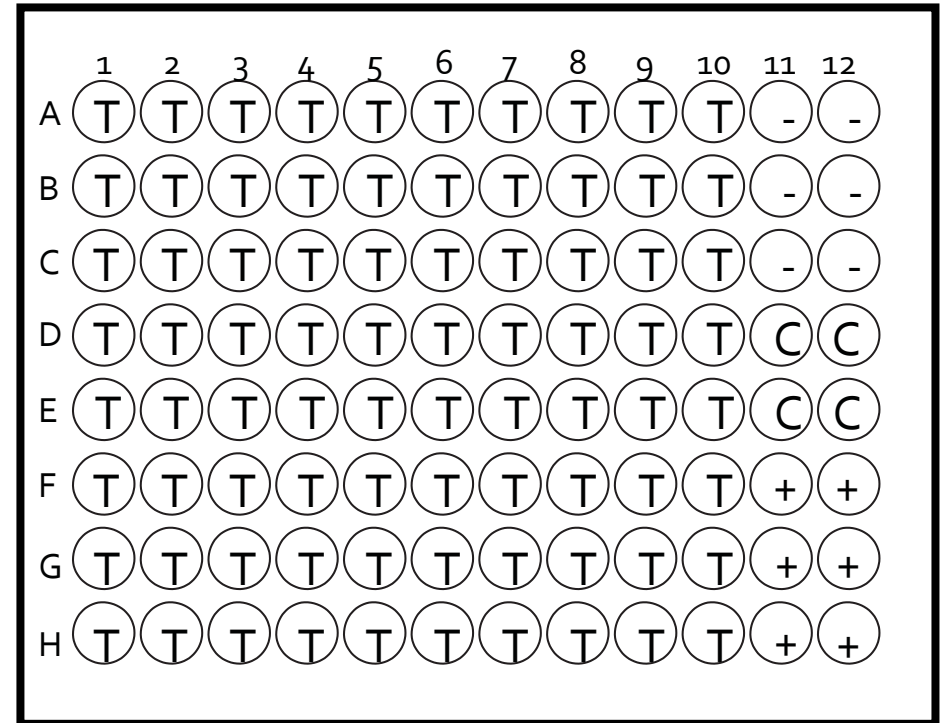
Incubateur (optionnel)

Remarques

Le lecteur de plaques microtitre n'est pas indispensable car la lecture des résultats peut être réalisée visuellement (voir la section 'Analyse des résultats').

L'utilisation d'un incubateur et/ou d'un agitateur est préférable mais on peut également adapter la méthode si ces équipements ne sont pas disponibles (voir la section 'Méthode').

Disposition des échantillons sur la plaque microtitre



C – Contrôle du conjugué

T – Echantillon à tester

+ Contrôle positif

- Contrôle négatif

En l'absence de lecteur de plaques, la plaque peut être évaluée visuellement pour déterminer si les échantillons sont positifs ou négatifs. Un échantillon fortement positif est identifié par un puit incolore, alors qu'un échantillon négatif apparaît coloré (orange). Les couleurs des puits des échantillons à tester doivent être comparés à celles des puits contrôles (négatifs = orange, positifs = incolore).

Problèmes courants

Tous les puits sont incolores après 20 minutes d'incubation

- L'eau oxygénée n'a pas été ajoutée à la solution d'OPD
- L'OPD n'a pas été reconstitué correctement
- Le conjugué n'est pas actif à la dilution utilisée
- L'eau oxygénée n'est pas active
- La concentration de l'eau oxygénée est incorrecte
- Le conjugué n'a pas été ajouté dans les puits

La couleur se développe trop lentement

- L'eau oxygénée n'est pas assez active
- Le conjugué n'est pas assez actif
- La température de la pièce et/ou des réactifs n'est pas adéquate

La couleur se développe trop vite

- Le conjugué n'a pas été préparé correctement
- L'eau distillée est de mauvaise qualité
- Le substrat chromogène est contaminé

Tous les puits sont colorés

- Le conjugué n'a pas été préparé correctement
- Rinçage mal effectué
- Le substrat chromogène est contaminé
- La solution tampon n'a pas été reconstituée correctement

Coloration de mauvaise qualité ou incomplète

- Problème de pipetage ou de rinçage
- Problème de mélange des réactifs
- Verrerie sale
- L'eau distillée est de mauvaise qualité

Echec du contrôle positif

- Temps d'incubation du substrat trop long.

Préparation des réactifs

- Les réactifs fournis sont sensibles aux changements de température et à la lumière. Ils doivent être préparés et conservés en respectant les instructions afin d'être efficaces pour l'analyse.
- Pour la préparation et le stockage des réactifs, de la verrerie très propre et de l'eau distillée stérile ou de l'eau potable de bonne qualité doivent être utilisées.
- **Prière de lire attentivement l'ensemble des instructions avant de commencer à utiliser le kit.**

Solution tampon de dilution

Préparer le tampon de dilution en mélangeant 5 comprimés de PBS, 500µl d'indicateur rouge phénol, 250µL de Tween 20 et 500ml d'eau distillée. Le pH doit être situé entre 7,2 et 7,6. Le rouge phénol vire au jaune en dessous de 7,2 et au violet au-dessus de 7,6. Si le pH de la solution tampon n'est pas dans l'intervalle requis, la solution doit être jetée. Stocker au frais, à 4°C ± 3°C. Se conserve pendant au maximum un mois après reconstitution.

Solution de rinçage

Préparer la solution de rinçage en mélangeant le contenu de l'ampoule de Na₂ HPO₄, 1ml de Tween 20 et 10 litres d'eau distillée. Cette solution peut être stockée à température ambiante (21°C ± 6°C). Se conserve pendant au maximum un mois après reconstitution.

Solution de conjugué

Préparer le conjugué en suivant les instructions inscrites sur l'ampoule. Une fois reconstituée, la solution de conjugué doit être utilisée immédiatement et ne peut être stockée (Voir Méthode – étape 1)

Solution d'arrêt

Préparer la solution d'arrêt en diluant le contenu de l'ampoule d'acide citrique dans 38 ml d'eau distillée. Stocker au frais, à 4°C ± 3°C. Se conserve pendant au maximum un mois après reconstitution.

Contrôles

Reconstituer les échantillons contrôles négatif et positif en ajoutant 1 ml d'eau distillée stérile dans chaque flacon. Laisser reposer jusqu'à dilution totale et vérifier que l'ensemble du lyophilisat a été remis en suspension avant utilisation. Peuvent être conservés au frais, à 4°C ± 3°C, pendant 1 semaine. Si les contrôles sont destinés à être conservés plus longtemps, aliquoter et mettre au congélateur à -20°C ± 5°C.

OPD

En l'absence d'agitateur magnétique, les comprimés de peroxyde d'hydrogène peuvent être dissous dans de l'eau distillée au maximum 20 minutes avant utilisation. Les comprimés d'OPD ne doivent être ajoutés à la solution que juste avant utilisation (Voir Méthode – étape 9).

Méthode

1. Remettre la solution tampon de dilution à température ambiante. Il est recommandé de la réchauffer au bain-marie à 23°C (\pm 3°C). Mélanger énergiquement le conjugué concentré (BM40) et diluer à la concentration de travail avec la solution tampon réchauffée en suivant les instructions inscrites sur l'ampoule de conjugué. Cette solution diluée ne peut pas être conservée.

NB Lorsque l'on sort le conjugué du congélateur, il est recommandé de le réchauffer en conservant l'ampoule dans la main avant d'ajouter la solution tampon réchauffée. Lorsqu'on vide l'ampoule de conjugué, une petite quantité de liquide peut rester au fond du récipient. Il faut impérativement prélever ce reliquat avec une pipette et l'ajouter à la solution, sous peine d'affecter les résultats du test.

2. Ajouter 20µl de sérum à tester par puit. Laisser les colonnes 11 et 12 libres pour les contrôles (Voir disposition page 7).

3. Ajouter 20µl de sérum contrôle positif dans chacun des puits F11, F12, G11, G12, H11 et H12.

4. Ajouter 20µl de sérum contrôle négatif dans chacun des puits A11, A12, B11, B12, C11 et C12.

5. Ne pas ajouter de sérum dans les puits D11, D12, E11 et E12, qui jouent le rôle de contrôles pour le conjugué.

6. Sans attendre, ajouter 100µl de solution de conjugué à la concentration de travail dans chaque puits. Cela donne une dilution finale des sérums au 1/6^{ème}.

7. Mettre la plaque sur l'agitateur de plaques microtitre et agiter vigoureusement pendant 2 minutes afin de mélanger le sérum et le conjugué. Couvrir la plaque avec un couvercle et laisser incubé à température ambiante (21°C \pm 6°C) pendant 30 minutes sur l'agitateur rotatif à 160 révolutions par minute.

Si aucun agitateur n'est disponible, agiter la plaque initialement pendant 30 secondes. Ensuite agiter manuellement pendant 10 secondes toutes les 10 minutes, en allongeant le temps total d'incubation à 1 heure. **Veiller à ne pas mélanger le contenu des différents puits.**

8. Agiter la plaque avant d'effectuer 5 rinçages successifs avec soit la solution de rinçage soit de l'eau potable d'un robinet à basse pression (laisser couler l'eau doucement avec un débit régulier). Égoutter la plaque en la tapotant fermement sur plusieurs épaisseurs de papier absorbant jusqu'à ce que tout le liquide soit évacué.

N.B. Le rinçage manuel est la méthode recommandée. Cependant si un appareil de rinçage s'est avéré adapté à l'usage prévu, il peut être employé. Le nombre de rinçages doit être ajusté en fonction de l'appareil. L'utilisation de l'équipement doit être validée dans le cadre de ce kit.

9. Immédiatement avant utilisation, préparer la solution de substrat en dissolvant un comprimé d'H₂O₂ dans 12ml d'eau distillée. Lorsque le comprimé est dissout, ajouter le comprimé d'OPD et mélanger vigoureusement.

La dissolution peut prendre plusieurs minutes, l'utilisation d'un agitateur magnétique permet d'accélérer le processus. Cette solution ne peut pas être conservée.

NB : La solution d'OPD est photosensible, elle doit être préparée juste avant utilisation, de préférence dans un récipient opaque.

10. Ajouter 100µl de solution d'OPD dans chaque puit. Laisser incubé la plaque à température ambiante (21°C \pm 6°C) pendant au moins 10 minutes et au plus 20 minutes.

NB Tapoter doucement la plaque toutes les 5 minutes pendant l'incubation du substrat. **Veiller à ne pas mélanger le contenu des différents puits.**

11. Allumer le lecteur de plaques et le laisser préchauffer pendant 10 minutes.

12. Ralentir la réaction enzymatique en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit.

13. Éponger le dessous de la plaque avec du papier absorbant pour retirer l'eau déposée par condensation. Lire la plaque à 450 nm. La lecture doit être effectuée dans les 10 minutes.

En l'absence de lecteur de plaques microtitre, la plaque peut être évaluée visuellement pour déterminer si les échantillons sont positifs ou négatifs (voir section suivante).

Analyse des résultats

L'absence de coloration indique que l'échantillon testé est positif. Le seuil de positivité est égal à 60% de la moyenne des densités optiques (DO) des 4 puits de contrôle du conjugué. Tout échantillon dont la DO est inférieure ou égale à cette valeur doit être considéré comme positif.

Critères de validation des plaques

Les résultats sont considérés comme valides lorsque les conditions suivantes sont remplies :

La moyenne des DO des 6 contrôles négatifs est supérieure à 0,700. (La moyenne optimale pour les contrôles négatifs est 1,000).

La moyenne des DO des 6 contrôles positifs est inférieure à 0,100.

La moyenne des DO des 4 contrôles conjugués est supérieure à 0,700 (La moyenne optimale pour les contrôles du conjugué est 1,000).

Le coefficient de liaison est supérieur à 10.

Coefficient de liaison = $\frac{\text{Moyenne des 6 contrôles négatifs}}{\text{Moyenne des 6 contrôles positifs}}$