

**VIROTECH Borrelia Vet. Hund/Dog-Pferd/Horse IgG ELISA
(Borrelia Vet. Hund/Dog-Pferd/Horse IgG ELISA)**

N° de commande : DC122.00

Code-couleur: or

UNIQUEMENT POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO CHEZ LES ANIMAUX



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Allemagne

Tél.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Site Internet: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Sommaire

1. Usage prévu	3
2. Principe du test	3
3. Contenu	3
4. Stockage et conservation du kit de test et des réactifs prêts à l'emploi.....	3
5. Mesures de précaution et mises en garde	3
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit).....	4
7. Réalisation du test DIAGNOSTIC À PARTIR DU SÉRUM	4
7.1 Substances d'analyse.....	4
7.2 Préparation des réactifs.....	4
7.3 Réalisation des tests VIROTECH ELISA.....	4
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	5
8. Évaluation du test.....	5
8.1 Schéma d'interprétation des IgG	5
8.2 Limites du test	6
9. Littérature	6
10. Schéma du déroulement du test	7

1. Usage prévu

Le test vétérinaire VIROTECH *Borrelia burgdorferi* (espèce *B. burgdorferi* stricto sensu) ELISA est un test ELISA indirect de détection semi-quantitative et qualitative des anticorps IgG spécifiques dans le sérum de chien et de cheval.

2. Principe du test

Les anticorps recherchés dans le sérum animal forment un immunocomplexe avec l'antigène fixé sur la plaque microtitre. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt.

3. Contenu

1. **Une microplaque [MTP]**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi)**, 2 x 50 ml, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20)**, 50 ml, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Témoin négatif d'IgG anti-chien [NÉG IgG chien]**, 1 300 µl, sérum canin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
5. **Témoin seuil d'IgG anti-chien [seuil IgG chien]**, 1 300 µl, sérum canin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
6. **Témoin positif d'IgG anti-chien [POS IgG chien]**, 1 300 µl, sérum canin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
7. **Conjugué d'IgG anti-chien**, 11 ml, conjugué lapin-péroxydase de raifort, contient des conservateurs, prêt à l'emploi
8. **Témoin négatif d'IgG anti-cheval [NÉG IgG cheval]**, 1 300 µl, sérum équin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
9. **Témoin seuil d'IgG anti-cheval [seuil IgG cheval]**, 1 300 µl, sérum équin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
10. **Témoin positif d'IgG anti-cheval [POS IgG cheval]**, 1 300 µl, sérum équin à stabilisateurs protéiques et conservateurs, prêt à l'emploi
11. **Conjugué d'IgG anti-cheval**, 11 ml, conjugué chèvre-péroxydase de raifort, contient des conservateurs, prêt à l'emploi
12. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5')**, 11 ml, prêt à l'emploi
13. **Solution d'arrêt au citrate**, 6 ml, contient un mélange à l'acide.

4. Stockage et conservation du kit de test et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Tous les échantillons, les échantillons dilués, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.

2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage.
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

7. Réalisation du test DIAGNOSTIC À PARTIR DU SÉRUM

Le respect scrupuleux des consignes de travail VIROTECH est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Substances d'analyse

On emploie des sérums comme substances d'analyse.

Toujours réaliser des dilutions à partir d'échantillons frais.

Les sérums doivent être congelés pour être conservés plus longtemps. Il faut éviter les décongelations multiples.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

7.2 Préparation des réactifs

Les témoins prêts à l'emploi (témoin positif, seuil, négatif) s'utilisent en fonction des paramètres et de l'espèce et exclusivement avec le lot de plaques du kit.

Les conjugués prêts à l'emploi sont également propres aux paramètres et à l'espèce, mais peuvent être utilisés avec un plus grand nombre de lots de plaques.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
1. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les barettes.
2. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
3. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).

7.3 Réalisation des tests VIROTECH ELISA

1. Au début de chaque test, pipeter systématiquement 100 µl du tampon de dilution prêt à l'emploi (valeur à blanc), des témoins IgG négatif, seuil et positif, ainsi que de sérums animaux dilués. Nous recommandons toujours d'analyser deux échantillons (valeur à blanc, témoins et échantillons de sérum) ; pour le témoin seuil, cette double approche est impérative. Dilution de travail des sérums animaux : 1:400 ; p. ex. pré-dilution : mélanger 10 µl de sérum + 90 µl de tampon de dilution (1:10) ; dilution secondaire : prélever 10 µl de ce mélange et y ajouter 390 µl de tampon de dilution par pipetage (1:40). Cela correspond à une dilution de 1:400.
2. Après la distribution, incuber la plaque à 37 °C pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. Mettre fin à la période d'incubation par quatre lavages effectués chacun à l'aide de 350 µl de solution de lavage pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
4. Pipeter 100 µl du conjugué propre à un animal et prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation du conjugué : 30 min à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB dans chacun des puits.
8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Interruption de la réaction à base de substrat : ajouter 50 µl de solution d'arrêt au citrate par pipetage dans chaque puits. Agiter prudemment et soigneusement la plaque jusqu'à ce que les liquides soient complètement mélangés et que leur couleur soit visiblement homogène dans tous les puits.
10. Mesurer les extinctions à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée en l'espace d'une heure à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests VIROTECH ELISA peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH recommande la procédure suivante :

1. Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
2. Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
3. Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Évaluation du test

Les témoins prêts à l'emploi font office de témoins de quantification pour le dosage semi-quantitatif des anticorps IgG spécifiques dont la concentration en unités VIROTECH (UV) peut être indiquée. La méthode est conçue pour compenser les éventuelles variations du test et offre de cette manière une reproductibilité élevée. On emploie les valeurs moyennes des valeurs DO pour calculer les UV.

1. Contrôle du bon fonctionnement du test

a) Valeurs de DO

La valeur de DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

Les valeurs de DO des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les valeurs de DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

2. Calcul des unités VIROTECH (VE)

Von den OD-Werten einer Doppelbestimmung ist der Mittelwert zu bilden. L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

UV (témoin positif) =	$\frac{\text{DO (témoin positif)}}{\text{DO (témoin seuil)}} \times 10$
UV (sérum animal) =	$\frac{\text{DO (sérum animal)}}{\text{DO (témoin seuil)}} \times 10$

8.1 Schéma d'interprétation des IgG

Résultat (VE)	Évaluation
< 8,0	négatif
8,0 à 12,0	zone grise
> 12,0	positif

1. Si les UV mesurées de l'échantillon sont > 12, l'échantillon est considéré positif.
2. Si les UV mesurées se situent dans la zone grise indiquée, la concentration des anticorps n'est pas très élevée ; les échantillons sont considérés dans la limite.

Pour détecter une infection avec certitude, il est nécessaire de doser la teneur en anticorps des seconds échantillons sériques : il faut analyser un échantillon sérique juste après le début de l'infection, et un second deux semaines après. Il convient de doser la concentration en anticorps des deux échantillons parallèlement, c.-à-d. au début d'un test. Il n'est pas possible d'établir un diagnostic correct sur base d'un seul échantillon sérique.

3. Si les valeurs mesurées sont inférieures à la zone grise définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgG spécifiques à un antigène. Les échantillons sont considérés négatifs.

8.2 Limites du test

L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.

9. Littérature

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982); Lyme disease – a tick-borne spirochetosis?; Science 216:1317-19.
2. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994); Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis; J. Infect. Dis. 169:313-318.
3. Sigal, L.H. and Curran, A.S.; Lyme disease: a multifocal worldwide epidemic; Annu. Rev. Publ. Health (1991); 12:85-109.
4. Barbour, A.G. and Hayes, S.F. (1986); Biology of *Borrelia* species; Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
5. Horst, H.; Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier; 3. überarbeitete Auflage; Demeter-Verlag im Spitta Verlag; 1997: 173-174, 176-178.
6. Liebisch, G.; Der Nachweis von Borrelien bei Haus und Wildtieren: Patienten oder Reservoir der Lyme-Borreliose?; 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; 8.-11. April 1997; Bad Nauheim.

Préparation des sérums animaux et de la solution de rinçage

▼ **Solution de lavage** : ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution des échantillons**
1:400

p. ex. :
mélanger 10 µl de sérum + 90 µl de tampon de dilution (tampon de dilution de sérum prêt à l'emploi)
à partir de ce mélange, 10 µl + 390 µl de tampon de dilution

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl de sérum animal blanc (tampon de dilution) et contrôles
↓		
Laver 4 fois		350 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du conjugué	30 minutes à 37 °C	100 µl de conjugué IgG
↓		
Laver 4 fois		350 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du substrat	30 minutes à 37 °C	100 µl de substrat
↓		
Arrêt		50 µl de solution d'arrêt agiter avec précaution
↓		
Mesure de l'extinction		photomètre à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)