



KIT ELISA pour l'identification *in vitro* de *Naegleria fowleri* Ref. 0130001

PRINCIPE DU TEST

Ce kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permet d'identifier la présence de *Naegleria fowleri* (Nf) dans des échantillons. Ces amibes libres pathogènes sont responsables de la méningo-encéphalite amibienne primitive. Ce test ELISA de type sandwich contient 6 barrettes de 16 puits sensibilisés par un anticorps monoclonal (AcM) spécifique de Nf. Cet AcM assure la capture des antigènes amibiens présents dans les échantillons et le contrôle positif du kit. Après une phase d'incubation puis de lavage, un second anticorps marqué à la biotine est ajouté afin de former le sandwich « anticorps de capture – antigène Nf – anticorps biotinylé ». Après une nouvelle incubation suivie d'un lavage, le complexe streptavidine-péroxydase est ajouté. Celui-ci se fixe sur l'anticorps marqué *via* sa biotine. Les barrettes sont de nouveau incubées puis lavées et remplies à l'aide d'une solution de révélation, qui est un substrat produisant une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de Nf présente dans l'échantillon initial. La densité optique (Absorbance) de chaque puits est lue à l'aide d'un spectrophotomètre de plaques à 405 nm.

PRECAUTION D'UTILISATION

La méningo-encéphalite amibienne primitive peut être fatale pour l'homme. Les précautions d'usage pour la manipulation d'échantillons potentiellement contaminés par Nf doivent être scrupuleusement respectées. L'usage de masques, de gants et de lunettes de protection est fortement recommandé. Ne pas prélever les réactifs à la bouche. N'utiliser que de la verrerie parfaitement propre. **L'ensemble des réactifs doit être conservé à +2-8°C et ramené à température ambiante (+20-25°C) avant utilisation.** Respecter les consignes de manipulation, les temps et les températures d'incubation : c'est indispensable pour assurer la précision des résultats.

COMPOSITION DU KIT

Support de microtitration sensibilisé avec l'AcM anti-Nf

6 « barrettes Nf 16 puits » emballées sous vide d'air

Solution de lavage concentrée 10 fois

1 flacon « solution de lavage 10X » contenant 15 ml

Contrôle positif (lysat de Nf inactivé par la chaleur)

1 flacon « contrôle positif » contenant 1.3 ml

Diluant contrôle

1 flacon « diluant contrôle » contenant 3 ml

Anticorps marqué à la biotine (prêt à l'emploi)

1 flacon « anticorps marqué » contenant 11.5 ml

Conjugué streptavidine-péroxydase (prêt à l'emploi)

1 flacon « conjugué peroxydase » contenant 11.5 ml

Solution de révélation (ABTS prêt à l'emploi)

1 flacon « solution de révélation » contenant 13 ml

MODE OPERATOIRE

Les échantillons ambiens sont testés individuellement.

Le mode opératoire décrit ci-après concerne des prélèvements issus de boîtes de culture sur gélose.

1 – Préparation de la solution de lavage, des points de gamme du contrôle positif et des échantillons de Nf

Préparer la solution de lavage en ajoutant les 15 ml de la solution de lavage 10X à 135 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Si les lavages sont réalisés à l'aide d'un laveur de microplaques, un volume plus important de solution de lavage peut être obtenu à partir de la dilution au 1/10^{ème} de PBS 10X *indicia* (flacon de 500 mL, ref. 0130002).

Préparer la gamme de contrôle positif (lysate de Nf inactivé par la chaleur) en réalisant des dilutions en cascade du 1/2 au 1/8^{ème} en diluant contrôle :

- Dilution au 1/2: Ajouter 120 µL de contrôle positif pur dans 120 µL de diluant contrôle et vortexer,
- Dilution au 1/4: Ajouter 120 µL de la dilution au 1/2 dans 120 µL de diluant contrôle et vortexer,
- Dilution au 1/8: Ajouter 120 µL de la dilution au 1/4 dans 120 µL de diluant contrôle et vortexer.

Préparer les échantillons en déposant chaque carré de gélose à tester dans un tube à essai contenant 555 µL de solution de lavage 1X. Vortexer.

2 – Dépôt des échantillons

Déposer 100 µL par puits de contrôle positif (pur dans le puits A1 et dilué au 1/2, 1/4 et 1/8 respectivement dans les puits B1, C1 et D1).

Pour le blanc optique, déposer dans le puits H2 100 µL de diluant contrôle. Ce puits ne contiendra aucun des réactifs cités ci-après, hormis la solution de révélation. Déposer à la place, lors de chaque étape, 100 µL de diluant contrôle. Procéder ainsi jusqu'au point 6.

Pour le témoin conjugué, déposer dans le puits G2 100 µL de diluant contrôle.

Pour chaque échantillon, 100 µL sont pipetés (attention à ne pas prélever de gélose).et déposés dans un puits.

Incuber la barrette pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation.

3 – Lavages

Effectuer 3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage.

4 – Dépôt de l'anticorps marqué à la biotine

Déposer 100 µL par puits de la solution d'anticorps marqué (solution prête à l'emploi) ; à l'exception du puits H2 (blanc optique) qui lui est rempli avec 100 µL de diluant contrôle.

Incuber la barrette pendant 30 minutes à température ambiante, sous agitation.

5 – Lavages

Effectuer 3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage.

6 – Dépôt du conjugué streptavidine- peroxydase

Déposer 100 µL par puits de la solution du conjugué streptavidine-péroxydase (solution prête à l'emploi) ; à l'exception du puits H2 (blanc optique) qui lui est rempli avec 100 µL de diluant contrôle.

Incuber la barrette pendant 30 minutes à température ambiante, sous agitation.

7 – Lavages

Effectuer 3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage.

8 – Révélation de l'activité enzymatique

La solution de révélation de l'activité enzymatique est présentée sous forme « prête à l'emploi ». Les consommables en contact avec la solution de révélation (cônes, pipettes, barquette...) doivent être neufs afin de ne pas la contaminer.

Déposer 100 µL par puits de la solution de révélation. Ce substrat, appelé ABTS pour Acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenethiazoline-6-sulfonique est un produit classé non dangereux selon la directive 67/548/EEC. Cependant pour une manipulation en toute sécurité, mieux vaut éviter toute inhalation, tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements.

Incuber la barrette pendant 10 minutes à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière.

9 – Lecture des absorbances

La densité optique du contenant de chaque puits (Absorbance) est lue par un spectrophotomètre de microplaques à 405 nm.

La densité optique du « blanc optique » (puits H2) doit être inférieure ou égale à 0.080 pour que le test ELISA soit valide. Si ce n'est pas le cas, le test doit être recommencé depuis le début à l'aide d'un nouveau kit.

La valeur du blanc optique est retranchée aux absorbances lues pour chacun des autres puits.

L'absorbance du « témoin conjugué » (puits G2) après retrait du blanc optique doit être inférieure à 0.100 pour que le test soit validé. Si ce n'est pas le cas, le test doit être recommencé depuis le début à l'aide d'un nouveau kit.

INTERPRETATION DES RESULTATS

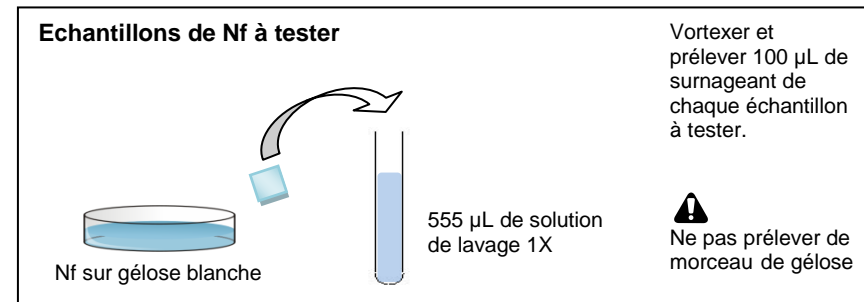
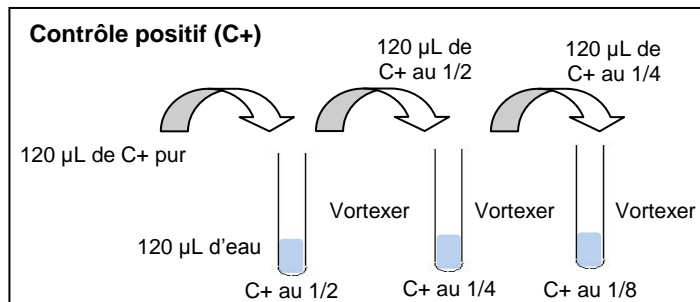
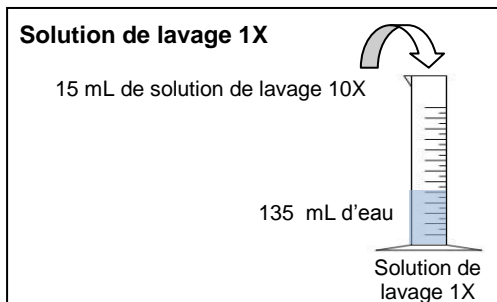
Un échantillon est considéré comme positif si sa densité optique à 405 nm (après retrait du blanc optique) est supérieure à 0.200. Pour les absorbances comprises entre 0.100 et 0.200, il est recommandé d'effectuer un nouvel essai en diluant l'échantillon au 1/2 afin de s'affranchir de tout effet Hook.

REFERENCES

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of Naegleria fowleri in environmental water sample - Reveiller FL, Varenne MP, Pougard C, Cabanes PA, Pringuez E, Pourima B, Legastelois S, Pernin P. - **J Eukaryot Microbiol.** 2003 Mar-Apr;**50(2):109-13.**

Rapid detection and enumeration of Naegleria fowleri in surface waters by solid-phase cytometry - Pougard C, Catala P, Drocourt JL, Legastelois S, Pernin P, Pringuez E, Lebaron P. - **Appl Environ Microbiol.** 2002 Jun;**68(6):3102-7.**

1 – Préparation de la solution de lavage, des points de gamme du contrôle positif et des échantillons de Nf



2 – Dépôts des échantillons

	1	2
A	C+ pur (100 µL)	Echantillon (100 µL)
B	C+ au 1/2 (100 µL)	Echantillon (100 µL)
C	C+ au 1/4 (100 µL)	Echantillon (100 µL)
D	C+ au 1/8 (100 µL)	Echantillon (100 µL)
E	Echantillon (100 µL)	Echantillon (100 µL)
F	Echantillon (100 µL)	Echantillon (100 µL)
G	Echantillon (100 µL)	Diluant contrôle (100 µL)
H	Echantillon (100 µL)	Diluant contrôle (100 µL)

Incubation 1h sous agitation à température ambiante

3 – Lavages

3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage 1X

4 – Dépôts de l'anticorps marqué à la biotine

	1	2
A	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
B	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
C	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
D	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
E	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
F	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
G	Anticorps marqué (100 µL)	Anticorps marqué (100 µL)
H	Anticorps marqué (100 µL)	Diluant contrôle (100 µL)

Incubation 30' sous agitation à température ambiante

5 – Lavages

3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage 1X

6 – Dépôts du conjugué streptavidine peroxydase

	1	2
A	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
B	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
C	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
D	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
E	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
F	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
G	Conjugué pérox (100 µL)	Conjugué pérox (100 µL)
H	Conjugué pérox (100 µL)	Diluant contrôle (100 µL)

Incubation 30' sous agitation à température ambiante

7 – Lavages

3 lavages à l'aide de 150 µL par puits de solution de lavage 1X

8 – Révélation de l'activité enzymatique

	1	2
A	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
B	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
C	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
D	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
E	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
F	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
G	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)
H	Sol. de révélation (100 µL)	Sol. de révélation (100 µL)

Incubation 10' sous agitation à température ambiante
A L'ABRI DE LA LUMIERE

9 – Lecture des absorbances à 405 nm

Pour que le test soit valide, il faut que :
1/ l'absorbance du « blanc optique » (puits H2) soit ≤ 0.080 . Cette valeur de blanc optique doit être retranchée de toutes les autres absorbances,
2/ l'absorbance du « témoin conjugué » (puits G2) après retrait du blanc optique soit < 0.100 .

Un échantillon est considéré comme positif si son absorbance corrigée à 405 nm est > 0.200 .