

## 1. PRINCIPE DE L'ESSAI

Ce test est utilisé pour détecter les bactéries inactives. Dans ce cas, l'échantillon d'intérêt est enduit et fixé sur une lame de verre. La présence de l'antigène est détectée à l'aide d'anticorps spécifiques. Après incubation et lavage, un second anticorps couplé au FITC est ajouté à la lame. L'anticorps secondaire est spécifique de l'espèce dans laquelle l'anticorps primaire est élevé. Le résultat est visualisé à l'aide d'un microscope doté d'une lumière ultraviolette. La sensibilité de ce test est généralement de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  bactéries / ml.

## 2. PROTOCOLE

### ANTIGENES

- Nettoyez les verres avec de l'alcool avant utilisation.
- Extraire l'échantillon à tester en broyant 0,5g de tissu dans 2ml de **tampon phosphate salin (PBS) 1X**. Homogénéiser. Dans certains cas, la quantité recommandée de tampon peut devoir être augmentée si l'extrait est trop visqueux pour le pipetage.
- Placer une goutte de 20  $\mu$ l de suspension de test bactérien sur une lame de verre propre. Répétez l'opération pour les contrôles.
- Fixer les échantillons en chauffant à 60°C pendant 20 minutes à l'aide d'une plaque chauffante thermostatée.

### ANTICORPS-Probe

code couleur : bleu

- Diluer l'anticorps secondaire dans le **tampon PBS 1X** comme recommandé sur l'étiquette du flacon (nous vous recommandons de tester la dilution dans vos propres conditions de laboratoire. La lame, les chambres d'incubation et l'optique du microscope utilisé peuvent influencer la dilution de travail et sont différentes d'un laboratoire à l'autre. Les titres peuvent varier de 250 à 5000 fois).
- Ajouter 20 $\mu$ l à chaque point de test (adapter le volume en fonction de la dilution).
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante dans une boîte humide hermétiquement fermée.
- Laver doucement la lame deux fois pendant 7 minutes avec du **tampon PBS 1X**. Rincer à l'eau distillée et éliminer soigneusement l'excès d'humidité.

### ANTICORPS-Conjugué FITC

code couleur : marron

- Diluer l'anticorps FITC-Anti-Espèce dans le **tampon PBS 1X** comme recommandé sur l'étiquette du flacon.
- Ajouter 20 $\mu$ l à chaque point de test (adapter le volume en fonction de la dilution).
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante dans une boîte humide hermétiquement fermée.
- Laver doucement la lame deux fois pendant 7 minutes avec du **tampon PBS 1X**. Rincer à l'eau distillée et éliminer soigneusement l'excès d'humidité.

**REVELATION**

- Étalez le tampon de glycérol (ou un autre milieu de montage) en gouttelettes sur les verres et recouvrez-le d'un verre standard approprié.
- Examiner à l'aide d'un microscope UV.

**3. RECOMMANDATIONS****▪ Stockage**

Stocker tous les réactifs et tampons à la température recommandée

**▪ Sécurité**

Eviter le contact direct avec les yeux ou la peau ou l'ingestion des différents composés

**4. FORMULATIONS TAMPONS****▪ PBS 1X**

Dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée :

NaCl .....	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O .....	2.9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g
KCl .....	0.2 g
NaN <sub>3</sub> .....	0.2 g

Cette solution est à 7.4

**▪ Tampon Glycerol**

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O.....	3.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O .....	0.15 g
Glycerol .....	50 ml

Update : 06/09/2021