



# MONOSCREEN<sup>®</sup> Ab ELISA

Notice d'utilisation  
BIOK063-ADN3\_NO\_(FR)\_V03  
26/04/2024

## Monoscreen AbELISA Adénovirus bovin 3

Référence : BIO K 063

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de l'adénovirus bovin 3

Bicupule, test indirect

Usage in vitro et strictement vétérinaire



Echantillon / dilution	Bovin
Sérum- plasmas* / 100X	✓
Lait / 4X	✓

\*Par la suite, nous retiendrons la dénomination sérum.

### Présentation

Référence produit	BIO K 063/2
Format	2 plaques, barrettes de 16 puits
Réactions	96 tests

### Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 063/2
Microplate	Microplaques	2
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 x 100 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (5X)	1 x 50 mL
TMB solution	Solution de TMB (1X)	1 x 25 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 x 15 mL
Conjugate	Conjugué (50X)	1 x 0,5 mL
CTL POS	Contrôle positif	1 x 0,5 mL
CTL NEG	Contrôle négatif	1 x 0,5 mL
Tracer	Traceur	1 x 0,5 mL

### Historique de révision

Date	Version	Modifications
26/04/2024	V03	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions

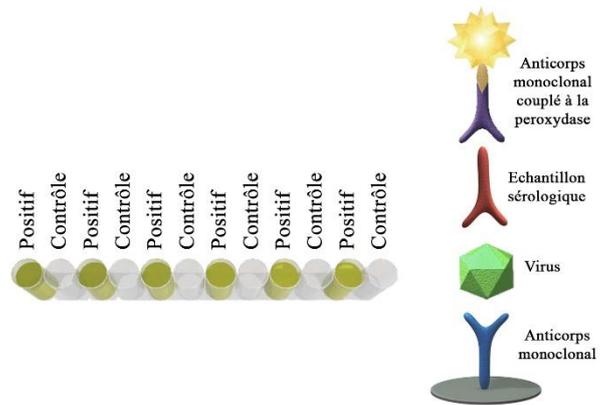
## A. Introduction

Jusqu'à présent, les adénovirus bovins sont classés en 9 sérotypes. Ces 9 sérotypes sont divisés en deux sous-groupes en se basant principalement sur le critère de leur répllication soit sur des cellules rénales de veau ou sur des cellules testiculaires (sous-groupe I, sérotypes 1 à 3 et 9) soit uniquement sur des cellules testiculaires (sous-groupe II, sérotypes 4 à 8). Les adénovirus faisant partie du sous-groupe II sont incapables de croître sur des cellules rénales établies de bovins.

Ces deux sous-groupes diffèrent également quant à leurs propriétés antigéniques. La distribution des adénovirus au sein des populations de bovidés est mondiale. Des analyses sérologiques suggèrent que l'infection par les adénovirus est très fréquente chez les bovins. On retrouve fréquemment des traces d'infection par les adénovirus dans les troupeaux de grande taille. Les virus sont excrétés par diverses voies et notamment par la toux. Les infections se produisent préférentiellement chez des veaux âgés de 3 semaines à 4 mois. Chez les animaux atteints, on peut observer des symptômes respiratoires et digestifs, de la fièvre et de l'anorexie. La maladie débute usuellement par des symptômes respiratoires. Le jetage séreux et la conjonctivite sont accompagnés par de la toux. L'atteinte digestive se traduit par de la salivation et par l'émission de selles jaunâtres ou grisâtres. La maladie peut être compliquée par une infection bactérienne secondaire. Le diagnostic des infections par des adénovirus passe obligatoirement par l'analyse, en ELISA de sérums couplés. S'il n'y a pas d'atteintes aiguës des animaux mais que l'on suspecte une infection du cheptel, une enquête sérologique peut être réalisée. Dans ce cas, un échantillon unique de sérum sanguin sera prélevé sur 5 à 10% des animaux adultes du cheptel et cet échantillon sera analysé en ELISA. La trousse Bio-X adénovirus bovin 3 est spécifique du sous-groupe I. Elle ne peut mettre en évidence une réponse d'un bovin que vis-à-vis des sérotypes 1, 3 et 9.

## B. Principe du test

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique de l'adénovirus bovin 3. Cet anticorps assure la capture du virus en même temps que sa purification à partir du lysat des cellules qui ont servi à sa croissance. Les colonnes impaires (1, 3, 5, 7, 9, 11) des microplaques contiennent le virus tandis que les colonnes paires (2, 4, 6, 8, 10, 12) renferment un lysat de cellules rénales bovines non infectées identiques à celles qui ont servi de substrat pour la multiplication du virus. On dispose de la sorte d'un témoin négatif qui permet de différencier les anticorps spécifiques du virus des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques des cellules rénales qui ont servi à la multiplication virale. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les sérums sanguins et les laits sont dilués dans la solution de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des IgG1 bovines couplé à la peroxydase, est ajouté. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21±3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB Monocomposant). Ce chromogène est plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et ne présente pas de propriétés cancérogènes. En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques de l'adénovirus bovin 3 dans le sérum ou dans le lait, le conjugué reste fixé dans la cupule contenant l'antigène viral et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques présents dans l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée par le milieu de culture est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'antigène viral. Il est possible de quantifier la réactivité des sérums inconnus suivant une échelle de positivité comprise entre 0 et +++++.



## C. Matériel supplémentaire et équipement requis non fournis

- Eau distillée/déminéralisée.
- Microplaques de dilution (facultatif).
- Pipette mono ou multicanaux de précision (gamme 2-20µL, 20-200 µL et 100-1000µL) et embouts à usage unique.
- Lecteur de microplaque (filtre 450nm).
- Laveur de microplaque (facultatif).
- Incubateur à 21±3°C.
- Matériel de laboratoire standard : cylindre gradué, béchers, tubes, portoirs...

## D. Précautions d'utilisation

- Conserver les réactifs entre +2 et +8°C.
- Les barrettes non utilisées sont conservées dans l'enveloppe d'aluminium fermée hermétiquement avec son dessiccant.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de validité.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousse.
- Veiller à utiliser de l'eau distillée/déminéralisée.
- La solution d'arrêt est de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Conserver la solution de TMB à l'abri de la lumière.

## E. Préparation des solutions

- Les solutions sont à préparer extemporanément.
- La solution de lavage est à diluer 20 fois dans de l'eau distillée/déminéralisée. La solution cristallise spontanément à froid. Amener le flacon à 21±3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent ; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire.
- La solution de dilution est à diluer 5 fois dans de l'eau distillée/déminéralisée. La solution de dilution est colorée en jaune. Elle est utilisée pour la dilution des échantillons, des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) et du conjugué.
- Le conjugué est à diluer 50 fois dans la solution de dilution.
- La solution d'arrêt est prête à l'emploi.
- La solution de TMB est prête à l'emploi. Elle doit être parfaitement incolore.
- Le traceur est un échantillon de référence qui peut être utilisé pour contrôler la reproductibilité intra-laboratoire du lot de la trousse. Il est à diluer 100 fois dans la solution de dilution.

## F. Préparation des échantillons

- Les échantillons de **sérum** et les témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) doivent être dilués **100 fois** dans la solution de dilution et homogénéisés. Éviter d'utiliser des échantillons de sérum hémolysés ou coagulés.

*Dilution recommandée :*

10 µL d'échantillon + 990 µL de solution de dilution

- Les échantillons de **lait** doivent être centrifugés 20 minutes à 4000g. Prélever ensuite le liquide intermédiaire en veillant à ne pas toucher le culot cellulaire sous-jacent. Les laits doivent être dilués **4 fois** dans la solution de dilution et homogénéisés.

*Dilution recommandée :*

250 µL d'échantillon + 750 µL de solution de dilution.

## G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à 21±3°C avant utilisation.
  - Lire attentivement les points précédents.
- Distribuer les échantillons de sérum ou de lait **dilués** et les témoins du kit **dilués** à raison de **100 µL par puits**. Couvrir et incuber la plaque à **21±3°C** pendant **60 ± 5min**.
  - Éliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Éviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
  - Distribuer le **conjugué dilué** à raison de **100 µL** par puits. Couvrir et incuber à **21±3°C** pendant **60±5min**.
  - Éliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Éviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
  - Distribuer **100 µL** de la solution de **TMB** par puits. Incuber à **21±3°C** pendant **10±1min** à l'abri de la lumière, sans couvrir.
  - Distribuer la solution d'arrêt à raison de **50 µL** par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
  - Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de **450nm** dans les **5 minutes** après l'ajout de la solution d'arrêt.

## H. Validation des résultats

Le test ne peut être **validé** que si :

- La différence entre les lectures de densité optique (DO) du puits impair et du puits pair du contrôle positif est supérieure à 0,600.

Contrôle positif :  $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} > 0,600$

- La différence entre les lectures de densité optique (DO) du puits impair et du puits pair du contrôle négatif est inférieure à 0,200

Contrôle négatif :  $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} < 0,200$

## I. Interprétation des résultats

- Calculer pour chaque échantillon sa « delta DO » en soustrayant la densité optique du puits pair à celle du puits impair.
- Procéder de même pour le contrôle positif et le contrôle négatif.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous forme de pourcentage.

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

En utilisant le tableau ci-dessous, déterminer le niveau de positivité des sérums ou des laits.

	Résultats	Statut
Échantillon	Val ≤ 10%	0
	10% < Val ≤ 33%	+
	33% < Val ≤ 56%	++
	56% < Val ≤ 79%	+++
	79% < Val ≤ 102%	++++
	Val > 102%	+++++

Seule la mise en évidence d'une séroconversion franche réalisée à partir de deux échantillons sériques couplés prélevés à 2-3 semaines d'intervalle peut fournir un diagnostic fiable. Le premier prélèvement devra être effectué durant la phase aiguë de l'affection. On considère qu'il y a séroconversion franche lorsqu'il y a un accroissement du signal de 2 croix (par exemple : ++ → +++ ou + → ++++). Un échantillon doit être considéré comme **positif** s'il fournit un résultat **supérieur ou égal à une croix**.

Obtenez rapidement et facilement l'interprétation de vos résultats grâce à notre plateforme en ligne gratuite **AnalysiScreen** disponible sur notre site web : <https://www.biox.com>



AnalysiScreen™ est le nouveau module de lecture et d'interprétation de tous les types de plaques ELISA Monoscreen™ et Multiscreen™. AnalysiScreen™ est :

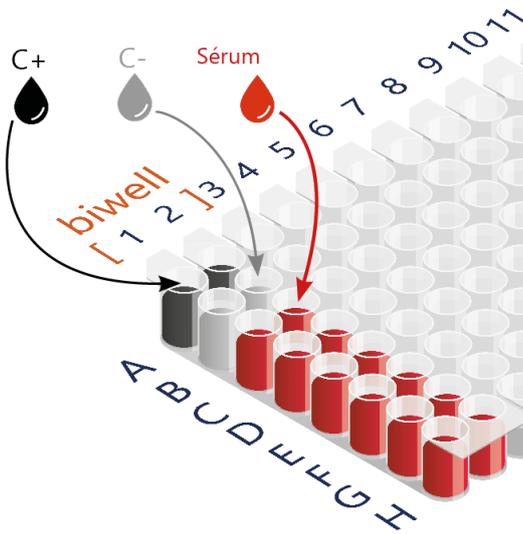
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : <https://www.biox.com>
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de plaques Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi



SCAN ME

## Protocole sérum

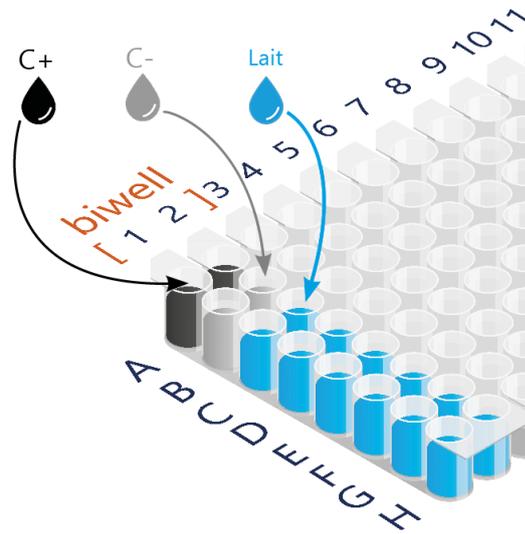
- 1 Dilution des échantillons 1/100  
Dilution des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) 1/100



Microplaque du kit

## Protocole lait

- 1 Dilution des échantillons 1/4  
Dilution des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) 1/100



Microplaque du kit

## Protocole commun

- 2 Ajouter 100  $\mu$ L de conjugué dilué (1/50)



- 3 Ajouter 100  $\mu$ L de TMB



- 4 Ajouter 50  $\mu$ L de solution d'arrêt

- 5 Enregistrer les densités optiques

450 nm



\* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.