MONOSCREEN Ab ELISA

Notice d'utilisation
BIOK061-BRSV_NO_(FR)_V03
30/04/2024

Monoscreen AbELISA BRSV

Référence : BIO K 061

Test ELISA pour le diagnostic sérologique du virus respiratoire syncytial bovin
Bicupule, test indirect

Usage in vitro et strictement vétérinaire

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

*Par la suite nous retiendrons la dénomination sérum.

Présentation

Référence produit	BIO K 061/2	BIO K 061/5
Format	2 plaques, barrettes de 16 puits	5 plaques, barrettes de 16 puits
Réactions	96 tests	240 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 061/2	BIO K 061/5
Microplate	Microplaques	2	5
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 x 100 mL	1 x 250 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (5X)	1 x 50 mL	1 x 100 mL
TMB solution	Solution de TMB (1X)	1 x 25 mL	1 x 55 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 x 15 mL	1 x 30 mL
Conjugate	Conjugué (50X)	1 x 0,5 mL	1 x 1,4 mL
CTL POS	Contrôle positif	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
CTL NEG	Contrôle négatif	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
Tracer	Traceur	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
30/04/2024	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

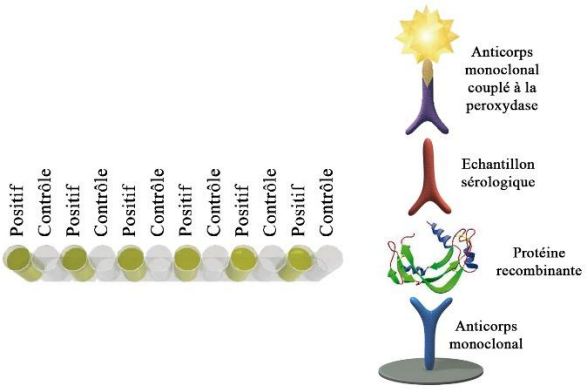
A. Introduction

Le BRSV est en Europe, le premier facteur étiologique responsable des affections respiratoires des jeunes bovidés. Il occasionne chez le bétail comme d'ailleurs chez l'enfant, une atteinte de l'arbre respiratoire profond. L'affection produit très souvent des lésions sévères responsables de pertes économiques importantes. Ainsi, on estime qu'en Europe, 7 millions de veaux souffrent chaque année de problèmes infectieux divers parmi lesquels 60% seraient respiratoires. Un million de veaux meurent chaque année d'affections respiratoires au sein de la Communauté Européenne. Si on tient compte des frais occasionnés par les traitements, par les retards de croissance et les mortalités, la perte totale est estimée à 450 millions d'EURO pour les veaux de moins d'un an. La perte financière occasionnée par le BRSV au veau laitier est de 25 EURO par animal.

Le BRSV touche principalement les jeunes animaux. Le bétail culard paye un lourd tribu à cette affection étant donné le développement important de sa masse musculaire en comparaison de son faible volume pulmonaire. Les manifestations cliniques de l'affection sont la plupart du temps assez sévères. On peut noter habituellement les signes d'une pneumonie sérieuse c'est-à-dire une polypnée accompagnée d'une hyperthermie importante. Les réinfections sont couramment observées mais elles sont la plupart du temps asymptomatiques. Le diagnostic clinique de l'affection est impossible, et il est nécessaire de recourir au laboratoire pour établir un diagnostic précis. Ce dernier peut être effectué par mise en évidence du virus sur une coupe de poumon à l'aide d'un anticorps spécifique couplé à la fluorescéine (immunofluorescence directe). Le diagnostic peut également être posé si on peut déceler une séroconversion nette vis-à-vis du virus. Pour ce faire, il conviendra de prélever un premier échantillon sanguin en phase aiguë de l'affection et d'en prélever un second 2 à 3 semaines plus tard, c'est-à-dire durant la phase de convalescence de l'animal. Ces deux sérums couplés seront évalués quant à leur spécificité vis-à-vis du virus syncytial par un test ELISA.

B. Principe du test

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisés par un anticorps monoclonal spécifique de la protéine de fusion F du virus BRSV. Cet anticorps assure la capture de la protéine F recombinante. Les colonnes impaires (1, 3, 5, 7, 9, 11) des microplaques contiennent la protéine recombinante F tandis que les colonnes paires (2, 4, 6, 8, 10, 12) renferment un antigène témoin. On dispose de la sorte d'un témoin négatif qui permet de différencier les anticorps spécifiques de la protéine F des anticorps dirigés contre l'antigène témoin. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les sérums sanguins, les plasmas 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 présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques du BRSV dans le sérum, le plasma, ou dans le lait, le conjugué reste fixé sur 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 l'antigène témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'antigène viral. Il est possible d'attribuer à ces échantillons un niveau de positivité compris entre 0 et +++++.



C. Matériel supplémentaire et équipement requis non fournis

- Eau distillée/déminéralisée.
- 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 trousses.
- 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, 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 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 4000 g. Prélever le liquide intermédiaire en veillant à ne pas toucher le culot cellulaire sous-jacent et diluer **4 fois** dans la solution de dilution et homogénéiser.

  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.

1. Distribuer les échantillons de sérum ou 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**.
2. 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.
3. Distribuer le **conjugué dilué** à raison de **100 µL** par puits. Couvrir et incuber à **21±3°C** pendant **60±5min**.
4. 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.
5. 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.
6. Distribuer la solution d'arrêt à raison de **50 µL** par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
7. 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 0,800.

  Contrôle positif : $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} > 0{,}800$

- La différence entre les lectures de densité optique (DO) du puits impair et du puits pair du contrôle négatif est inférieure à 0,300.

  Contrôle négatif : $DO_{\text{puits impair}} - DO_{\text{puits pair}} < 0{,}300$

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 ≤ 20%	0
	20% < Val ≤ 40%	+
	40% < Val ≤ 60%	++
	60% < Val ≤ 80%	+++
	80% < Val ≤ 100%	++++
	Val > 100%	+++++

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

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

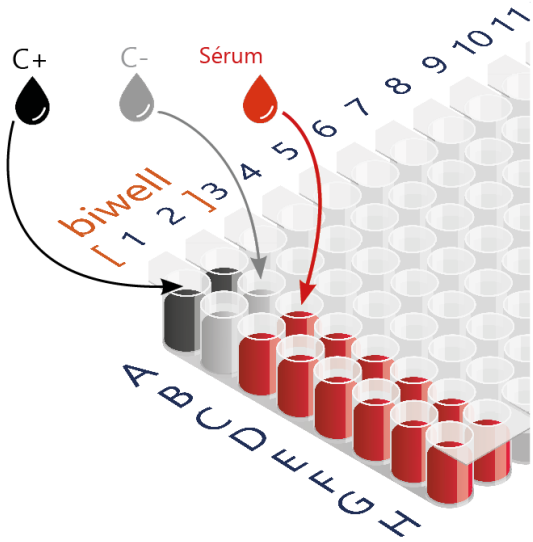
- Gratuit
- Accessible en ligne via notre site internet : https://www.biox.com
- Mis à jour en temps réel
- Compatible avec tous les designs de plaques Bio-X Diagnostics
- Très simple d'emploi

SCAN ME

Notes*

Protocole sérum

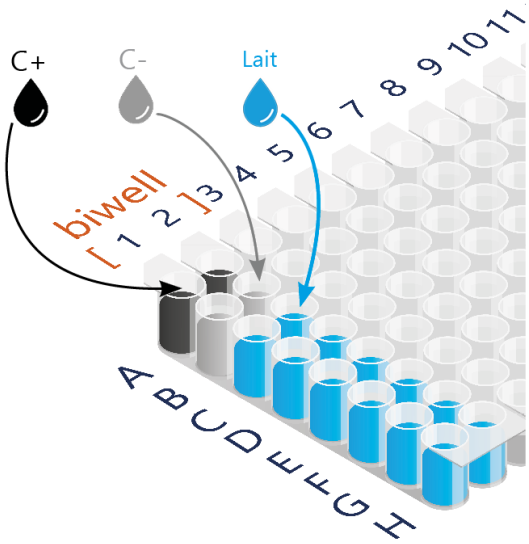
1 Dilution des échantillons 1/100
Dilution des témoins du kit (contrôle positif et négatif et traceur) 1/100



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

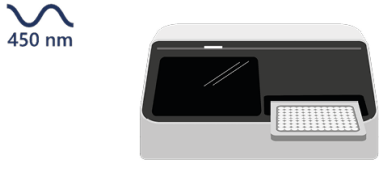
Protocole commun

2 Ajouter 100 µL de conjugué dilué (1/50)

3 Ajouter 100 µL de TMB

4 Ajouter 50 µL de solution d'arrêt

5 Enregistrer les densités optiques



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

Contact us
support.immuno@biox.com
www.biox.com +32 (0) 84 32 23 77
Bio-X Diagnostics
38, rue de la Calestienne
5580 Rochefort (Belgium)