



MONOSCREEN[®] Ab ELISA

Mannheimia haemolytica

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de *Mannheimia haemolytica*

Test indirect pour sérums sanguins et plasmas

Test diagnostique pour bovins

Monocupule

I - INTRODUCTION

Mannheimia haemolytica est l'agent responsable de la pneumonie epizootique du bétail appelée également fièvre des transports ou pneumonie à *Pasteurella*. 90 % des cas cliniques sont causés par le biotype A sérotype 1 de *Mannheimia haemolytica* mais également par *Pasteurella multocida*. *Mannheimia haemolytica* est souvent un agent secondaire retrouvé après une infection virale telle que celles causées par le virus Parainfluenza-3 ou l'IBR ou après une infection bactérienne causée par *Mycoplasma*.

Des facteurs de stress environnementaux peuvent également agir en tant qu'agents primaires.

Mannheimia haemolytica peut contribuer à la pneumonie enzootique des veaux et des agneaux et à la péritonite du mouton. Elle est également responsable de mammites gangréneuses du mouton. Les souches de *Mannheimia* produisent souvent une cytotoxine appelée leucotoxine. Cette dernière provoque la lyse des leucocytes des ruminants. La leucotoxine est un membre du groupe des toxines RTX. Cette toxine est probablement largement responsable de la pathogénicité de la bactérie dans les cas de septicémie et de pneumonie.

II - PRINCIPE DU TEST

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par du lipopolysaccharide (LPS) de *Mannheimia haemolytica*. L'entièreté des microplaques est sensibilisée par le LPS. Les sérums sanguins et les plasmas sont dilués dans le tampon de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, de la protéine G couplée à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 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 de *Mannheimia haemolytica* dans le sérum ou le plasma, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant le LPS 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. Il est possible d'attribuer à ces échantillons un niveau de positivité compris entre + et +++++.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : microplaques de 96 puits (barrettes de 8 puits). L'entièreté des microplaques est sensibilisée par le LPS de *Mannheimia haemolytica*
- **Solution de lavage** : 1 flacon de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle, amener le flacon à 21°C +/- 3°C jusqu'à disparition complète des cristaux, mélanger la solution et prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
- **Tampon de dilution** : 1 flacon de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois. Le contenu du flacon est à diluer dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums sanguins, des plasmas et du conjugué. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : 1 flacon de Protéine G couplée à la peroxydase de raifort.
- **Sérum positif** : 1 flacon contenant le sérum positif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Sérum négatif** : 1 flacon contenant le sérum négatif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C. à l'abri de la lumière. **Il est prêt à l'emploi.**
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 139/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 15 ml (1 X)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Bêchers, tubes en plastic, microplaque de dilution, portoir pour tubes, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel).

V - PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic "in vitro" et il est à usage strictement vétérinaire.
- Les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C. Les réactifs ne peuvent être garantis si leur date de péremption est dépassée et/ou s'ils n'ont pas été conservés dans les conditions décrites dans cette notice.
- La solution de lavage et le tampon de dilution concentrés peuvent être stockés à température ambiante. Après dilution, ces solutions ont une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C.
- Les barrettes non utilisées doivent être stockées immédiatement dans l'enveloppe d'aluminium en veillant à conserver le dessicant bien sec et en fermant hermétiquement l'enveloppe. Si ces précautions sont scrupuleusement respectées, il est possible de préserver l'activité des barrettes jusqu'à la date de péremption de la trousse.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousse.
- Il est important de veiller à la qualité de l'eau utilisée pour préparer les diverses solutions de la trousse. Ainsi, il ne faut pas utiliser d'eau susceptible de contenir des agents oxydants (hypochlorite de soude) ou des sels de métaux lourds car ils pourraient réagir avec le chromogène.
- Ecarter les solutions contaminées par des bactéries ou des champignons.
- La solution d'arrêt contient de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Le matériel utilisé qui a été en contact avec les échantillons doit être considéré comme potentiellement infectieux et être éliminé en respectant la législation en vigueur du pays.
- Pour garantir la fiabilité des résultats, il importe de respecter parfaitement le protocole. On veillera particulièrement à respecter les temps et les températures d'incubation ainsi que la précision des volumes et des dilutions.

VI – MODE OPERATOIRE

1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation. Retirer la microplaque de son emballage.

2- PREPARATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

2.1- Préparation des sérums sanguins et des plasmas.

Les sérums sanguins ou les plasmas doivent être dilués au 1/100. Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula.

2.1.1- Dilution en tube

Distribuer 990 µl de tampon de dilution, préparé suivant les modalités décrites au chapitre "composition de la trousse" dans des tubes de 5 ou de 10 ml. Ajouter dans chacun de ces tubes 10 µl des échantillons et agiter brièvement sur un agitateur mécanique (dilution finale au 1/100).

2.1.2- Dilution en microplaque

Distribuer 20 µl de chacun des échantillons dans les micropuits d'une plaque de dilution. Ajouter 180 µl de tampon de dilution. Mélanger 5 fois par aspiration-refoulement ou par agitation orbitale (dilution au 1/10). Distribuer 90 µl de tampon de dilution dans la microplaque de la trousse. Transférer 10 µl des échantillons pré-dilués au 1/10. Mélanger 5 fois par aspiration-refoulement ou par agitation orbitale (dilution finale : 1/100).

2.2- Dilution des sérums de référence de la trousse (positif et négatif)

Les sérums positif et négatif doivent être dilués au 1/100 dans le tampon de dilution. Réaliser cette dilution en une étape en tube (voir point 2.1.1) ou en deux étapes en microplaque de dilution (voir point 2.1.2).

3- Distribuer les échantillons à raison de 100 µl par puits. Une cupule par échantillon. Procéder de la même manière pour les sérums positif et négatif.

Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une heure.

4- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies au chapitre "composition de la trousse". Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. A l'issue de ces 3 lavages, passer au point suivant.

L'utilisation d'un laveur de plaques (automatique ou manuel) est également conseillée. Il est cependant nécessaire de régler la profondeur d'immersion des aiguilles de manière à ne pas altérer la couche de réactifs adsorbés sur le fond des puits.

5- Diluer au 1/50 le conjugué dans le tampon de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 250 µl de la solution mère de conjugué dans 12,25 ml de solution de dilution).

Ajouter dans chaque puits utilisé, 100 µl du conjugué.

Couvrir et incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.

6- Laver la plaque comme décrit au point 4.

7- Distribuer le TMB sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution doit être parfaitement incolore. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution par de la peroxydase. Si cette éventualité se présente, la solution doit être éliminée et du nouveau TMB doit être prélevé avec du matériel parfaitement propre.

8- Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C à l'obscurité et sans couvrir.

Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.

9- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.

10- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Le test ne peut être **validé** que si la différence de densité optique entre le sérum positif et le sérum négatif (DO sérum positif – DO sérum négatif) fournit une valeur en dix minutes supérieure à 0,400 et le sérum négatif une densité optique inférieure à 0,300.

Calculer pour chaque sérum son coefficient en appliquant la formule suivante :

$$\text{Coef éch} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO sérum négatif}}{\text{DO sérum positif} - \text{DO sérum négatif}} \times 100$$

En utilisant les tableaux ci-dessous, déterminer le niveau de positivité des sérums ou des plasmas.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	23 %	< Val <=	87 %	< Val <=	151 %	< Val <=	216 %	< Val <=	280 %	< Val

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 (+)**.

VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA *Mannheimia haemolytica*:

2 X 96 tests

BIO K 139/2

