



# MONOSCREEN<sup>®</sup> Ag ELISA

## BVDV

Test ELISA pour le diagnostic antigénique  
du virus de la diarrhée virale bovine  
Test sandwich de détection de la protéine NS3 sur leucocytes  
Test diagnostique pour bovins  
Monocupule

### ***I - INTRODUCTION***

Le virus BVDV est responsable de deux pathologies différentes: la diarrhée virale bovine et la maladie des muqueuses. La maladie des muqueuses a toujours une issue fatale. Elle résulte de la surinfection d'un animal infecté permanent immunotolérant (animal contaminé de manière transplacentaire entre le 40ème et le 120ème jour de la gestation). Les animaux immunotolérants infectés permanents excrètent continuellement le virus sous sa forme non cytopathogène et sont donc principalement responsables de la transmission de la maladie. La surinfection par une souche cytopathogène identique à la souche non cytopathogène hébergée par l'animal infecté persistant entraîne l'apparition de la maladie des muqueuses.

La lutte contre le BVDV passe donc par l'identification des animaux infectés persistants. La détection de ces animaux est possible par la technique ELISA, plus facile à mettre en oeuvre que la mise en culture des échantillons. Les résultats des deux méthodes sont d'ailleurs convergents, bien que l'ELISA ne permette pas toujours de détecter les animaux virémiques transitoires.

### ***II - PRINCIPE DU TEST***

Les microplaques ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de la protéine NS3 du BVDV. Cet anticorps assure la capture de la protéine virale à partir d'un échantillon de leucocytes purifiés. L'échantillon est mis à incuber sur la plaque une heure à 21°C +/- 3°C. Après cette incubation, la plaque est rincée et on applique le conjugué (un anticorps monoclonal anti-NS3 du BVDV couplé à la peroxydase), puis la plaque est mise à incuber une heure à 21°C +/- 3°C. Après une étape de rinçage, on ajoute la solution de révélation (TMB monocomposant).

En cas de présence d'un agent pathogène dans l'échantillon, le conjugué reste fixé dans la cupule correspondante et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en agent pathogène de l'échantillon. Après arrêt de la réaction par une solution acide, la densité optique des échantillons est lue à 450 nm.

Le seuil de positivité du test est exprimé sous la forme d'un pourcentage de la densité optique du témoin positif fourni.

Le test ELISA permet de détecter les animaux immunotolérants mais pas systématiquement les animaux virémiques transitoires.

### III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : 2 microplaques de 12x8 puits.
- **Solution d'hémolyse** : 1 flacon de 100 ml de tampon d'hémolyse concentré 10 X.
- **Solution de lyse** : 1 flacon de 100 ml de solution de lyse des leucocytes prête à l'emploi.
- **Solution de lavage** : 1 flacon de 100 ml de solution de lavage concentrée 20 X.
- **Témoin positif** : 1 flacon de témoin positif lyophilisé (souche C24V inactivée).  
Suspendre le contenu de ce flacon dans 1 ml d'eau distillée ou déminéralisée.
- **Témoin négatif** : 1 flacon de 1 ml.
- **Conjugué** : 1 flacon de 25 ml de conjugué anti-BVDV couplé à la peroxydase. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de 25 ml 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 15 ml de solution d'arrêt (acide phosphorique 1 M).

	BIO K 258/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Solution d'hémolyse	1 x 100 ml (10 X)
Solution de lyse	1 X 100 ml (1 X)
Conjugué	1 X 25 ml (1 X)
Témoin positif	1 X 1 ml (1 X) lyophilisé
Témoin négatif	1 x 1 ml (1 X)
Solution TMB mono-composant	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 verre, 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, la solution d'hémolyse concentrées peuvent être stockés à température ambiante. Après dilution, ces solutions ont une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C.
- Après reconstitution, le témoin positif peut être conservé 2 semaines entre +2°C et +8°C, ou plus longtemps à -20°C. Afin d'éviter les problèmes liés aux cycles de congélation et de décongélation, il est recommandé d'aliquoter ce réactif avant de le congeler.
- 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

### A. PREPARATION DES ECHANTILLONS.

#### Préparation des leucocytes :

1. Préparer la quantité nécessaire de tampon d'hémolyse (3 ml par échantillon) en la diluant 10 X dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
2. Déposer 3 ml de tampon d'hémolyse dans un tube en verre correctement identifié.
3. Ajouter 2 ml de sang complet par tube.
4. Agiter au vortex.
5. Incuber 5 à 15 minutes à 21°C +/- 3°C afin d'obtenir la lyse complète des hématies.  
Ce temps d'incubation doit être augmenté si la lyse est incomplète.
6. Centrifuger 15 minutes à 1000 g.
7. Eliminer le surnageant en tapant le tube renversé sur un papier absorbant.
8. Remettre le culot de leucocytes en suspension dans 200 µl de solution de lyse à l'aide d'une pipette.
9. Déposer 100 µl de leucocytes dans la cupule sans dilution préalable.

### B. REALISATION DU TEST.

1. Préparer la quantité nécessaire de solution de lavage en diluant 20 X la solution concentrée dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
2. Reconstituer le témoin positif en introduisant dans le flacon 1 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Le témoin positif reconstitué peut être conservé 2 semaines entre +2°C et +8°C, ou mieux, aliquoté et congelé à -20°C. Le témoin positif est à utiliser au 1/2 dans la solution de lyse (50 µl de solution de lyse + 50 µl de témoin positif). Il est préconisé de le déposer en double sur la plaque.
3. Préparer le plan de la plaque en disposant les échantillons en simple, ou mieux, en double.
4. Distribuer les échantillons et les témoins positif et négatif sur la plaque.  
Par puits :
  - soit 100 µl de leucocytes purifiés,
  - soit 100 µl de témoin positif dilué au 1/2 dans la solution de lyse.
  - soit 100 µl de témoin négatif dilué au 1/2 dans la solution de lyse.
5. Incuber une heure à 21°C +/- 3°C. Utiliser un couvercle.
6. Après l'incubation, rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée au point 1. 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. Recommencer l'opération jusqu'à disparition de toute trace colorée. Eviter la formation de bulles. Il est possible d'avoir recours à un laveur automatique, éviter cependant de laisser les aiguilles de distribution se rapprocher trop près du fond des puits.
7. Distribuer le conjugué anti-BVDV à raison de 100 µl par puits.
8. Incuber une heure à 21°C +/- 3°C. Utiliser un couvercle.
9. Rincer 3 fois la plaque à l'aide de la solution de lavage.
10. Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur (TMB) doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette.
11. Incuber sans couvrir 10 minutes, à l'abri de la lumière.
12. Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
13. A l'aide d'un lecteur de microplaques, enregistrer le plus rapidement possible les densités optiques à 450 nm.

## VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Calculer la moyenne des densités optiques du témoin positif D<sub>Om</sub>(TP), du témoin négatif D<sub>Om</sub>(TN) et de chaque échantillon D<sub>Om</sub>(Ech) s'ils ont été testés en double.

Le test est validé si D<sub>Om</sub>(TP) est compris entre les valeurs indiquées dans le contrôle de qualité annexé à la notice.

La moyenne des densités optiques du témoin négatif D<sub>Om</sub>(TN) doit se situer en dessous de 0,2 x la densité optique de la moyenne des TP D<sub>Om</sub>(TP).

$$D_{Om}(TN) < 0,2 \times D_{Om}(TP)$$

Calculer pour chaque échantillon inconnu son coefficient en appliquant la formule suivante:

$$\text{Coef éch} = \frac{DO \text{ éch} - D_{Om}(TN)}{D_{Om}(TP) - D_{Om}(TN)}$$

Un échantillon est négatif si son coefficient est inférieur à 0,08 .

Un échantillon est douteux si son coefficient est supérieur ou égal à 0,08 et inférieur à 0,12. Retester l'échantillon ultérieurement ou mieux prélever un nouvel échantillon chez l'animal.

Un échantillon est positif si son coefficient est supérieur ou égal à 0,12.

## VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AgELISA BVDV:

2 X 96 tests

BIO K 258/2

