

MULTISCREEN[®] Ab ELISA

Notice d'utilisation
BIOK369-Respi-RPMMC_NO_(FR)_V03
10/03/2025

Multiscreen AbELISA Respiratoire bovin

Référence : BIO K 369

Test ELISA pour le diagnostic sérologique du BRSV, BPI3, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica* et Coronavirus Bicipule, test indirect

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon / Dilution	Bovin
Sérum – Plasma* / 100X	✓

*Par la suite, nous retiendrons la dénomination sérum.

Présentation

Référence produit	BIO K 369/2
Format	2 plaques, barrettes de 8 puits
Réactions	32 tests

Composition du kit

Matériel fourni		BIO K 369/2
Microplate	Microplaques	2
Washing solution	Solution de lavage (20X)	1 X 100 mL
Dilution solution	Solution de dilution colorée (5X)	1 X 50 mL
Conjugate	Conjugué (50X)	1 X 0,5 mL
CTL POS	Contrôle positif (1X)	1 X 0,5 mL
CTL NEG	Contrôle négatif (1X)	1 X 0,5 mL
TMB solution	Solution de TMB Monocomposant (1X)	1 X 25 mL
Stop solution	Solution d'arrêt (1X)	1 X 30 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
03/02/2025	V02	Mise en page et simplification de l'ensemble de la notice. Remplacement de l'Adénovirus bovin 3 par le Coronavirus.
10/03/2025	V03	Modification du volume de solution d'arrêt de 15 mL à 30 mL. Modification du volume de distribution de la solution d'arrêt de 50 à 100 µL par puits.

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

Les affections respiratoires constituent chez les bovins un problème préoccupant étant donné leur fréquence et le nombre élevé d'animaux qui en souffrent. Ces affections se rencontrent dans tous les pays qui pratiquent un système d'élevage intensif impliquant le regroupement d'un grand nombre d'animaux dans des espaces limités. L'étiologie de ces affections est multifactorielle, ce qui en complique la pathogénie mais aussi le traitement. Des agents viraux et bactériens en association avec un état de stress provenant soit de déplacements dans des véhicules surpeuplés, soit de maintien des animaux dans des étables mal entretenues ou mal ventilées, jouent un rôle important dans le déclenchement d'affections respiratoires aiguës. Ces affections touchent plus particulièrement les jeunes animaux bien qu'elles puissent également affecter les adultes. Dans la plupart des cas, les animaux souffrant d'affections respiratoires hébergent plusieurs agents pathogènes dont certains agissent en synergie. Ainsi, il est généralement reconnu que les virus sont les premiers agents à intervenir et que les bactéries agissant comme second envahisseur, accentuent la pathologie. La fièvre des transports, "shipping fever", est un bel exemple de la synergie d'action qui peut exister au niveau de l'arbre respiratoire entre un virus, le BPI3, et une bactérie comme *Mannheimia haemolytica*.

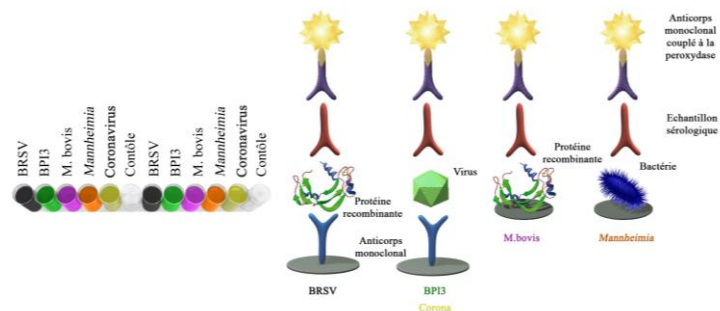
La trousse ELISA respiratoire de Bio-X permet d'évaluer la réponse immunitaire humorale des bovins contre 5 agents fréquemment impliqués dans ces affections respiratoires. Ces agents sont le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), le virus parainfluenza 3 (BPI3), le Coronavirus, *Mannheimia haemolytica* et *Mycoplasma bovis*.

B. Principe du test

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques des trois agents pathogènes (BRSV, BPI3 et coronavirus). Les anticorps assurent la capture et la purification de ces agents à partir du lysat des cellules qui ont servi à leur croissance. Pour *Mycoplasma bovis*, une protéine recombinante exprimée chez *E. coli* est utilisée pour sensibiliser les colonnes correspondantes. Pour *Mannheimia haemolytica* les colonnes correspondantes sont sensibilisées par du lipopolysaccharide (LPS). La répartition sur la microplaque de ces agents est la suivante :

- Colonnes 1 et 7 : BRSV
- Colonnes 2 et 8 : BPI3
- Colonnes 3 et 9 : *Mycoplasma bovis*
- Colonnes 4 et 10 : *Mannheimia haemolytica*
- Colonnes 5 et 11 : Coronavirus
- Colonnes 6 et 12 : Témoin cellulaire

Les colonnes 6 et 12 contiennent un anticorps monoclonal. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre de sérums faussement positifs. Les sérums et plasmas à tester sont dilués au 1/100 dans la solution de dilution et sont incubés durant une heure à 21±3°C. Après incubation et lavage de la préparation, le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des IgG1 bovines couplé à la peroxydase, est ajouté. À 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 dans les échantillons testés, le conjugué reste fixé sur 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 anticorps spécifiques présents dans l'échantillon. Les signaux enregistrés sur les cupules témoins (colonnes 6 et 12) sont retranchés des signaux des cupules positives correspondantes. 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.
- Pipette mono ou multicanaux de précision (gamme 2-20 µL, 20-200 µL et 100-1000 µL) avec embouts à usage unique et réservoirs à réactifs.
- Lecteur de microplaques (filtre 450 nm).
- Laveur de microplaques (facultatif).
- Microplaque de dilution (facultatif).
- Matériel de laboratoire standard : cylindre gradué, portoir, couvercle, ...
- Incubateur à 21±3°C.

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 contrôles du kit (positif et négatif) 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.

F. Préparation des échantillons

- Les sérums et les contrôles du kit sont à diluer 100 fois dans la solution de dilution. Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula.

Dilution recommandée :

990 µL solution de dilution + 10 µL échantillon

G. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à **21 ± 3°C** avant utilisation.
 - Lire attentivement les points précédents.
1. Distribuer les échantillons et les contrôles du kit **dilués** à raison de **100 µL par puits** en respectant la disposition suivante, par exemple : Contrôle positif : puits H1 à H6, contrôle négatif puits G1 à G6, échantillon 1 : puits A1 à A6, échantillon 2 : puits B1 à B6, etc...
Couvrir et incuber la plaque à **21 ± 3°C** pendant **60 ± 5 min**.
 2. Eliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Eviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
 3. Ajouter **100 µL de conjugué dilué** par puits.
Couvrir et incuber la plaque à **21 ± 3°C** pendant **60 ± 5 min**.
 4. Eliminer le contenu de la microplaque. **Laver 3 fois** la microplaque avec **300 µL** de solution de lavage par puits. Eviter la formation de bulles dans les cupules entre chaque lavage.
 5. Distribuer **100 µL** de la solution de TMB par puits. La solution doit être parfaitement incolore.
Incuber à **21 ± 3°C** pendant **10 ± 1 min** à l'abri de la lumière, sans couvrir.
 6. Distribuer la solution d'arrêt à raison de **100 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 **450 nm** dans les **5 minutes** après l'ajout de la solution d'arrêt.

H. Validation des résultats

Le test ne peut être **validé** que si le contrôle positif fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure pour chaque valence aux valeurs suivantes :

BRSV	> 1,200
BPI3	> 0,800
<i>M. bovis</i>	> 1,200
<i>Mannheimia</i>	> 1,000
Coronavirus	> 1,200

Et le contrôle négatif, une différence de densité optique en dix minutes inférieure pour chaque valence à 0,300.

I. Interprétation des résultats

- Soustraire de chaque valeur de densité optique enregistrée sur les puits correspondants au contrôle positif et au contrôle négatif le signal du puits témoins négatif correspondant (puits 6) et noter le résultat obtenu (calcul des delta DO). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives.
- Effectuer les mêmes opérations pour les puits 1, 2, 3, 4, 5.

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

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

En utilisant le tableau en bas de page, déterminer le niveau de positivité des échantillons.

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 BioX-Diagnostics
- Très simple d'emploi

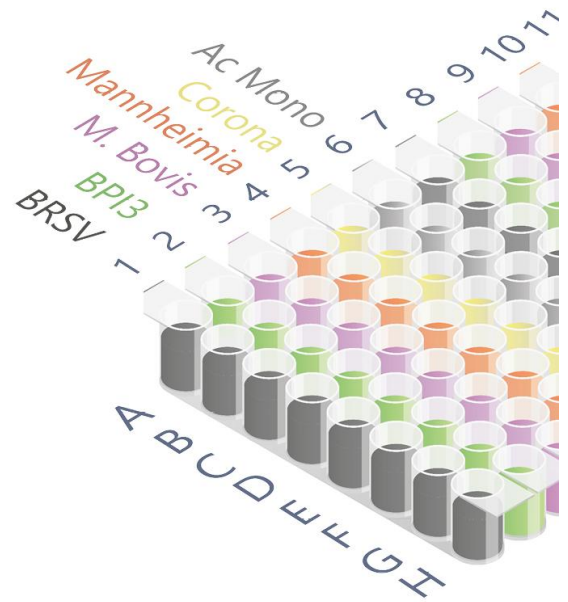


SCAN ME

	0	+	++	+++	++++	+++++
BRSV	Val ≤ 20%	< Val ≤ 41%	< Val ≤ 62%	< Val ≤ 84%	< Val ≤ 105%	< Val
BPI3	Val ≤ 30%	< Val ≤ 59%	< Val ≤ 88%	< Val ≤ 116%	< Val ≤ 145%	< Val
<i>M. bovis</i>	Val ≤ 66%	< Val ≤ 85%	< Val ≤ 103%	< Val ≤ 122%	< Val ≤ 140%	< Val
<i>Man. Haemo</i>	Val ≤ 20%	< Val ≤ 40%	< Val ≤ 60%	< Val ≤ 80%	< Val ≤ 100%	< Val
Corona	Val ≤ 60%	< Val ≤ 70%	< Val ≤ 80%	< Val ≤ 90%	< Val ≤ 100%	< Val

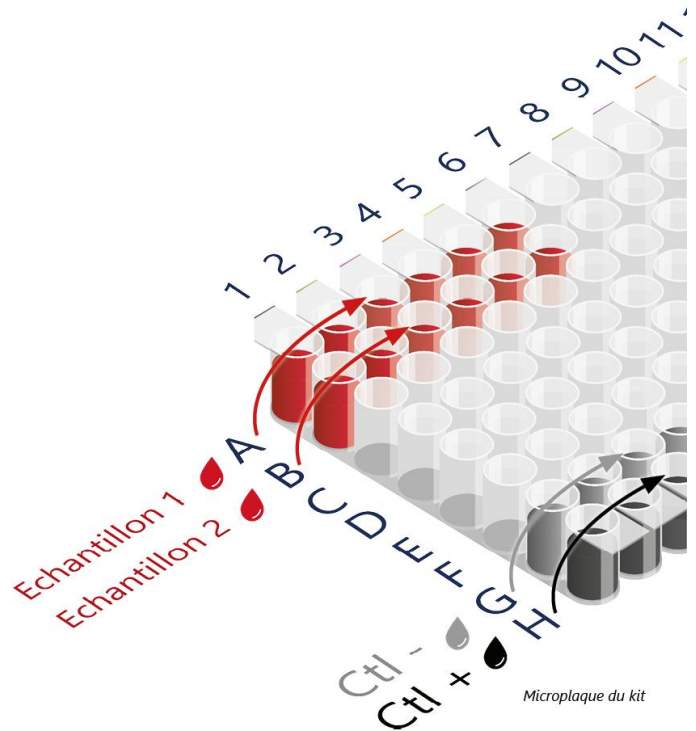
Notes*

- 1 Distribuez 100µL des échantillons dilués 1/100 et des contrôles du kit dilués (Ctl+ & Ctl-) 1/100



Microplaque du kit

- 2 Ajouter 100 µL de conjugué 1/50



Microplaque du kit

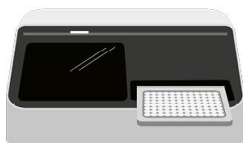
- 3 Ajouter 100 µL de TMB



- 4 Ajouter 100 µL 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.